

10/505452

Rec'd PCT TO 01 SEP 2004

1/4

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2002年03月05日 (05.03.2002) 火曜日 09時44分31秒

A21081M

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.01.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A21081M
I	発明の名称	固体化組織免疫アジュバント
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	セルメデシン株式会社
II-4en	Name	CELL-MEDICINE, INC.
II-5ja	あて名:	300-1234 日本国 茨城県 牛久市 中央1丁目18番地12
II-5en	Address:	18-12, Chuo 1-chome Ushiku-shi, Ibaraki 300-1234 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4ja	氏名(姓名)	大野 忠夫
III-1-4en	Name (LAST, First)	OHNO, Tadao
III-1-5ja	あて名:	300-1234 日本国 茨城県 牛久市 中央1丁目18番地12
III-1-5en	Address:	18-12, Chuo 1-chome Ushiku-shi, Ibaraki 300-1234 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2002年03月05日 (05.03.2002) 火曜日 09時44分31秒

A21081M

III-2	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4j a	氏名(姓名)	内村 英次
III-2-4e n	Name (LAST, First)	UCHIMURA, Eiji
III-2-5j a	あて名:	305-0024 日本国 茨城県 つくば市 倉掛 1093 カマラードつくば B105
III-2-5e n	Address:	B105, Camarade tsukuba, 1093, Kurakake Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0024 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	今村 正純
IV-1-1en	Name (LAST, First)	IMAMURA, Masazumi
IV-1-2ja	あて名:	104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋 1 丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階
IV-1-2en	Address:	8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3538-5680
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3538-5686
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	塩澤 寿夫; 釜田 淳爾
IV-2-1en	Name(s)	SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハアレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国

特許協力条約に基づく国際出願願書

A21081M




原本（出願用） - 印刷日時 2002年03月05日 (05.03.2002) 火曜日 09時44分31秒

V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI	優先権主張	なし (NONE)	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国 を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性 喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書 (申立てを含む)	4	-
IX-2	明細書	43	-
IX-3	請求の範囲	2	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	0	-
IX-7	合計	50	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本	✓	-
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当す る特許印紙を貼付した書 面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振 込みを証明する書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の 番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	

特許協力条約に基づく国際出願願書

A21081M

原本（出願用） - 印刷日時 2002年03月05日 (05.03.2002) 火曜日 09時44分31秒

X-1	提出者の記名押印	
X-1-1	氏名(姓名)	今村 正純 
X-2	提出者の記名押印	
X-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫 
X-3	提出者の記名押印	
X-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾 

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面 :	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

A21081M

原本(出願用) - 印刷日時 2002年03月05日 (05.03.2002) 火曜日 09時44分31秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号.			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	様式-PCT/R0/101 (付属書)			
0-4-1	このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.01.2002)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A21081M		
2	出願人	セルメデシン株式会社		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000	
12-2-1	調査手数料 S	⇒	72,000	
12-2-2	国際調査機関	JP		
12-3	国際手数料			
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	47,800		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	20		
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,100		
12-6	合計の手数料 b2	22,000		
12-7	b1 + b2 = B	69,800		
12-8	指定手数料			
	国際出願に含まれる指定国 数	92		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 5)	5		
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	10,300		
12-11	合計の指定手数料 D	51,500		
12-12	PCT-EASYによる料金の減 額 R	-14,700		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	106,600	
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	196,600	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 郵便口座への振込み 優先権証明書請求手数料:		

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及	9 6 2 1 弁理士 今村正純
13-1-2	出願人による言及	9 2 6 3 弁理士 塩澤寿夫
13-1-3	出願人による言及	9 5 8 4 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。(以下の国が指定から はずされています: KP) 確認してください。

13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-4	EASYによるチェック結果 優先権	Green? 優先権の主張が一つもなされていませんが、よろしいですか?
13-2-7	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしいですか?
13-2-10	EASYによるチェック結果 注釈	Green? 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASY の機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-11	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASY は英語版ないし西欧言語版以外のWindows 上で動作しています。ASCII 文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

明 細 書

固体化組織免疫アジュバント

技術分野

本発明は固体化組織免疫アジュバントの製造方法に関するものであり、該方法は、一般的免疫反応の強化方法、並びに抗腫瘍免疫反応による腫瘍の再発予防、転移阻害、及び治療に有用な方法である。

背景技術

抗原とともに生体に投与すれば抗原に対する免疫反応を増強するという従来から知られている免疫アジュバントには様々なものがあるが、ほとんどすべての免疫アジュバントは炎症反応を惹起し、炎症反応局所に集合してくる免疫担当細胞を活性化する。近年になって、免疫担当細胞の中で免疫反応の中心的役割を担うのは抗原提示細胞であって、しかもその中で最も強力な細胞は樹状細胞であることが明らかになってきた (Dendritic Cells, second edition, ed. By Lotze, M. T. and Thomson, A. W., Academic Press, San Diego, 2001)。末梢血中には微粒子状の抗原を貪食できる未成熟な樹状細胞が流れており、in vitro で培養中の樹状細胞にエンドトキシンの主成分である lipopolysaccharide (LPS) を添加すると、強力な抗原提示能がある成熟した樹状細胞となることが明らかにされている。この過程において活性化した樹状細胞は、granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、interleukin(IL)-12、interferon-gamma(IFNg) など、種々のサイトカインを放出する。しかも GM-CSF 自体は樹状細胞の細胞成長因子として必須である。従って、一旦活性化した樹状細胞は、GM-CSF のオートクライン機構によって長期に活性化状態を保ち生存し続けていくことが可能となる。

エンドトキシンやそれを含む大腸菌を生体内に直接投与した場合、強烈なショック症状を引き起こすことはよく知られた事実である。そのため、このような作

用がない比較的安全な細菌類（例えば *Mycobacterium bovis* BCG（以下、BCG 菌という））が免疫アジュバントとして利用される。しかし、この細菌類は比較的安全とはいえ、菌体ないし菌体成分をそのまま使用する場合、好ましからざる副作用が惹起されることが多い。例えば、BCG 菌体は注射した皮膚に潰瘍を発生させることは広く知られている事実である。*Corynebacterium parvum*（以下、C. parvum）菌体は、腫瘍の制御を目的とした腫瘍免疫実験系で動物に注射すると強力な抗腫瘍作用を示すが、脾臓肥大、肝臓肥大を惹起する。もともと、C. parvum 菌体から得たピリジン抽出液中の成分は、この望ましからざる反応を引き起こさずに抗腫瘍作用を示し、この現象は BCG 菌等、他の抗腫瘍反応誘起性細菌でも同等であることが知られている（Cantrell, J. L., US Patent 4663306）。このように、アジュバント活性を保ちつつ、しかも生体に対する毒性がない腫瘍免疫アジュバントを開発することは、免疫学における重要な課題であった。

従来から知られる多種多様な免疫アジュバントの中でも、ヒト腫瘍の治療、転移、及び再発予防の目的で腫瘍免疫療法に使用し得る安全でかつ低価格の免疫アジュバントは少ない。例えば、培養樹状細胞を利用した腫瘍免疫療法では、keyhole limpet hemocyanin (KLH) がアジュバントとして使用されているが（Geiger, J. D., et al., Cancer Res. 61: 8513-8519, 2001）、KLH はスカシガイから採取するため非常に高価であるという欠点がある。もちろん樹状細胞を活性化する GM-CSF などのサイトカイン類を直接アジュバントとして投与するという方法もあるが、サイトカイン類はなお一層高価である。また、C. parvum 菌体ピリジン抽出液も含め、これらの物質は溶解性であり、体内で急速に拡散消失するという問題点があった。

一方、*M. tuberculosis* の培養濾過液中の成分は、溶解状態では弱いアジュバント活性しかないが、ポリスチレン微粒子に結合することによって T 細胞反応を促進する（Wilkinson, K. A., et al., J. Immunol. Methods, 235: 1-9, 2000）。すなわち、溶解状態のアジュバントを不溶性のアジュバントキャリアー上に固定すれば、急速に拡散消失せず、強いアジュバント活性を示すようになる。ただし、

ポリスチレン微粒子は抗原提示細胞に貪食されるが、細胞内で分解されず、体内に残存する望まじからざるプラスチックとなる。

この問題点を解決する方法として、この文献中には、合成生分解性高分子の微粒子に、細菌の培養濾過液中の成分を結合させる方法も引用されている (Vordermeier, H.M., et al., Vaccine, 13, 1576-1582, 1995; Ertl, H.C., et al., Vaccine, 14, 879-885, 1996; Jones D.H., et al., J. Biotechnology, 44, 29-36, 1996; Venkataprasad, N., et al., Vaccine, 17, 1814-1819, 1999)。ただし、記載された合成高分子 poly (DL-lactide co-glycolide) (PLG) は分解時に乳酸を発生し、分解局所環境を酸性化することがわかっており、やはり生体にとっては望ましいものではない。

発明の開示

腫瘍免疫学の分野では、固体状で、しかも生分解性でありながら、上述のような望まじからざる作用がないアジュバントキャリアーが望まれていた。また、従来の技術では、複雑多岐にわたる腫瘍抗原を含む腫瘍組織又は腫瘍細胞を固体状にした上で、免疫アジュバントを結合し、一体として抗原提示細胞に供給し、該細胞による腫瘍抗原処理を効率的に刺激できる方法はなかった。

本発明者らは上記の問題点を解決すべく鋭意努力した結果、以下のポイントを組み合わせることにより、優れたアジュバントを提供できることを見出した。

(1) 固体化し微粒子化した腫瘍組織を GM-CSF 等のサイトカインとともに体内に投与すれば、効率よく、腫瘍細胞に対する抗腫瘍免疫反応を誘導できること (PCT/JP00/00692 「腫瘍ワクチン」) から、GM-CSF 自体がアジュバントとなっていること、従って、免疫アジュバントの刺激を受けた抗原提示細胞から産生された GM-CSF の量は、元のアジュバントの活性を表す指標となり得る。

(2) 抗腫瘍免疫反応の過程においては、死んだ腫瘍細胞は、抗原提示細胞に貪食されて分解され、これによって生成した腫瘍抗原が抗原提示細胞表面上の主要組織適合抗原 (MHC) クラス I 分子上に提示されて、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)

を活性化し、CTL が腫瘍細胞を殺す (Dhodapkar K. M., et al., J. Exp. Med. 195: 125-133, 2002)。

そのため、固定処理によって腫瘍細胞を殺した腫瘍組織にアジュバント活性物質を固着させれば、貪食作用によってアジュバント活性物質と死んだ腫瘍細胞が同時に抗原提示細胞内に持ち込まれると考えられる。この場合、必ずしも固定腫瘍組織でなくても、固定し固体化した生体組織であれば、弱いアジュバント活性しかない可溶性物質であっても、固着した当該生体組織と一体となって貪食されるため、固体化不溶性アジュバントとしてふるまい、極めて効率よく貪食細胞を刺激できるものとなる。しかもそのキャリアーとなった固体化生体組織自体は細胞内で分解処理されてしまうため、アジュバントとしての安全性も高いものとなる。

(3) ホルマリンは生体高分子に架橋反応を惹起し、網の目状に結合された生体高分子は不溶化する。いわゆるホルマリンによる生体組織の固定はこの反応により行われるものである。ポリオに対するソークワクチンの発明以来、ホルマリン不活化ワクチンは多々使用されてきた。また、歯科治療では、歯髄を固定するためにホルマリンを常用する。いわゆる歯の神経を殺す操作である。この固定歯髄は物理的に大部分を除去するとはいえ、歯髄に残る残存固定組織自体は宿主個体になんらの影響も及ぼさず、やがて消失する。これら知見は、ホルマリン固定生体組織の安全性に問題がないことを示唆している。従って、固体化生体組織として、ホルマリン固定組織を使用すれば、ヒトにも投与できる安全性の高いものとなる。

(4) ヒトの場合は、他者の組織に対する免疫拒絶反応があるために、他者由来の生きている細胞を使用すればアジュバント活性を示す（例えば他人どうしのリンパ球を混ぜ合わせることにより、強いリンパ球増殖誘導が起こる）ことは周知だが、他者の固定組織自体も免疫アジュバント活性を維持している可能性があり、一般的免疫アジュバントとして利用可能であろうと推定できる。また、ヒト以外の動物組織も、例えばブタの組織は、ヒトに移植すれば強力な免疫拒絶反応を引

き起こすため、固定したブタ組織でも十分なアジュバント活性を持つことも想像できる。しかも、ヒトの場合、腫瘍患者の摘出腫瘍組織を固定してアジュバントキャリアーとすれば、その中に含まれるあらゆる種類の腫瘍抗原が、固着しているアジュバント活性物質と一体となって抗原提示細胞に取り込まれていくと考えられる。

(5) さらに、腫瘍患者の摘出腫瘍組織を当該腫瘍患者自身に投与する場合、その中に含まれる腫瘍抗原以外は本来当該患者の正常組織と同じものであるため抗原として認識されないが、この際、免疫アジュバントと一体化して固体化摘出腫瘍組織を投与すれば、当該腫瘍患者自身の腫瘍抗原のみに対する特異的免疫反応を効率よく刺激でき、優れた自家腫瘍ワクチンとなり得る。

(6) アジュバント活性をヒトで測定するためには、樹状細胞が含まれている血中付着性細胞から産生された GM-CSF の量を指標として測定すればよく、この測定は体外実験系で可能である。

すなわち、本発明は、免疫アジュバントであって、ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製され、有機溶媒及び／又は熱水で洗浄することにより可溶性成分が除去された断片を含み、該断片に微生物に由来する可溶性成分が固定化された免疫アジュバントを提供するものである。

本発明の別の観点からは、免疫アジュバントの製造方法であって、以下の工程：

(a) ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製された断片を、有機溶媒及び／又は熱水にて洗浄して可溶性成分を除去する工程；及び

(b) 上記工程 (a) で得られた該断片に微生物に由来する可溶性成分を固定化する工程

を含む方法が提供される。

上記発明の好ましい態様によれば、ヒトの組織又は細胞として腫瘍組織及び／又は腫瘍細胞が用いられ、ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分から

なる群から選ばれる固体化材料として、ホルマリン固定組織及び/又はホルマリン固定細胞を用いることができる。また、微生物として細菌を用いることができ、微生物に由来する可溶性成分としては、アルコール抽出物、アセトン抽出物、ピリジン抽出物、又は熱水抽出物を用いることができる。

さらに別の観点からは、ヒトの組織又は細胞として腫瘍組織及び/又は腫瘍細胞を用いて調製した上記の免疫アジュバントを有効成分として含む腫瘍ワクチンが本発明により提供される。さらに、別の観点からは、上記の免疫アジュバントを該腫瘍が由来した患者に投与する腫瘍の治療方法が本発明により提供される。

発明を実施するための最良の形態

本発明の免疫アジュバントは、ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料（以下、「固体化生体材料」と呼ぶ場合がある）から調製され、有機溶媒及び/又は熱水で洗浄することにより可溶性成分が除去された断片を含み、該断片に微生物に由来する可溶性成分が固定化されていることを特徴としている。

本発明の免疫アジュバントは、弱いアジュバント活性を持つ微生物由来の可溶性成分、好ましくは細菌由来の可溶性成分が固定化された不溶性のアジュバントであり、アジュバントが細胞に貪食されることにより、細胞表面の至近距離ないし細胞内部から刺激を加え、強い活性のあるアジュバントとして作用する。

本発明の好ましい態様によれば、細菌などから抽出したアジュバント活性の弱い微量の可溶性成分を固体化生体材料の断片に固定化することによって、血中付着性細胞からLPSで刺激した場合に比肩できる高い濃度のGM-CSFを放出させることができる。

また、本発明の別の好ましい態様によれば、固体化生体材料の断片として腫瘍患者の手術後のホルマリン固定腫瘍組織断片を用い、これに微量の微生物、好ましくは細菌から抽出したアジュバント活性の弱い可溶性成分を固定化することによって調製された免疫アジュバントが提供される。該免疫アジュバントをヒトの

血中付着性細胞中の抗原提示細胞（単球、マクロファージ、未成熟樹状細胞など）や体組織内の抗原提示細胞に取り込ませることによって、該腫瘍組織に含まれる腫瘍抗原に反応する CTL を誘導でき、その殺腫瘍細胞作用によって、術後患者のがんの再発防止、転移予防、及び／又は残存がんの治療が可能となる。

本発明の免疫アジュバントの製造方法は、典型的には以下の工程：

（a）ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製された断片を、有機溶媒及び／又は熱水で洗浄することにより可溶性成分を除去する工程；及び

（b）アジュバント活性のある微生物、好ましくは細菌から有機溶媒及び／又は熱水で該微生物由来の可溶性成分を抽出した後、得られた抽出液を工程（a）で得られた断片に接触させ、該可溶性成分を該断片に固定化する工程を含む。

上記工程（b）により該可溶化成分を固定化した固体化生体材料の断片を水または通常の生理食塩水にて洗浄し、未吸着の可溶性成分を除去することにより、微生物由来の可溶性成分のうち容易には遊離しない可溶性成分が固定化されたアジュバントを製造できる。

上記（a）の工程において使用される固体化生体材料の種類は特に限定されないが、例えばホルマリンで固定された生体組織を用いることができる。ホルマリンで固定された生体組織は、通常、そのままでは相当量の脂質を含んでいるが、アルコールや熱水で洗浄して脱脂することが望ましい。

固体化生体材料を断片化するとこの脱脂は容易となり、脂質以外にもアルコール可溶性成分や熱水可溶性成分（例えばペプチド等の低分子成分）も除去される。この結果、ホルマリンによる分子間結合によって不溶化した生体組織骨格構造が残るが、この構造物は固体化生体材料として特に好ましいものである。

固体化生体材料から断片を調製する方法は特に限定されず、例えばホモゲナイザーで細かな断片とする手段や通常の破碎手段など、当業者に周知の方法を用いることができる。本明細書において、「断片」とは、破碎、切断などの手段により

調製された細かな調製物のことを意味しているが、調製の手段は限定されず、「断片」をいかなる意味においても限定的に解釈してはならない。通常は、0.04mm 程度の大きさの断片を調製することが好ましいが、断片の大きさは特に限定されることはない。

固体化生体材料の断片を有機溶媒及び／又は熱水で洗浄する方法も特に限定されず、当業者に周知の方法を用いればよい。例えば、エタノールまたは 40℃を越える熱水を用いて洗浄を行うことが好ましい。洗浄には、有機溶媒（好ましくはエタノール）と熱水の混合物を用いてもよいが、有機溶媒による洗浄と熱水による洗浄を順次行ってもよく、そのような洗浄を繰り返し行ってもよい。固体化生体材料の断片に対する有機溶媒及び／又は熱水の量も特に限定されるものではないが、例えば、断片を調製する前の固体化生体組織 1 g に対して 50～100 ml の有機溶媒及び／又は熱水を用いることが好ましい。有機溶媒及び／又は熱水を断片に添加して十分に攪拌した後、遠心分離して上清を除くことにより洗浄された断片を調製することができる。

上記（b）の工程において使用できる微生物としては、例えば細菌、真菌、又は放線菌などを例示できるが、好ましくは細菌を用いることができる。より好ましい細菌の例を以下に示す。これらの細菌群のうち、いずれか 1 種類、あるいは複数の種類を組み合わせ用いてもよい。

コリネバクテリウム・ジフテリエ (*Corynebacterium diphtheriae*); コリネバクテリウム・シュードツベルクロシス (*Corynebacterium pseudotuberculosis*); コリネバクテリウム・ゼロシス (*Corynebacterium xerosis*); コリネバクテリウム・レナレ (*Corynebacterium renale*); コリネバクテリウム・クチェリ (*Corynebacterium kutscheri*); コリネバクテリウム・シュードジフテリチカム (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*); コリネバクテリウム・エクイ (*Corynebacterium equi*); コリネバクテリウム・ボビス (*Corynebacterium bovis*); コリネバクテリウム・パルバム (*Corynebacterium parvum*); コリネバクテリウム・パウロメタボラム (*Corynebacterium paurometabolum*); コリネバクテリウ

ム・ピオゲネス (*Corynebacterium pyogenes*); コリネバクテリウム・エンジミカム (*Corynebacterium enzymicum*); コリネバクテリウム・ホアギイ (*Corynebacterium hoagii*); コリネバクテリウム・ストリアタム (*Corynebacterium striatum*); コリネバクテリウム・ムリセプチカム (*Corynebacterium murisepticum*); コリネバクテリウム・ネフリジイ (*Corynebacterium nephridii*); コリネバクテリウム・フォケ (*Corynebacterium phocae*); コリネバクテリウム・バギナリス (*Corynebacterium vaginalis*); ミクロバクテリウム・フラバム (*Microbacterium flavum*); コリネバクテリウム・ファシアンス (*Corynebacterium fascians*); コリネバクテリウム・ラタイ (*Corynebacterium rathayi*); コリネバクテリウム・アグロピリ (*Corynebacterium agropyri*); コリネバクテリウム・トリチシ (*Corynebacterium tritici*); コリネバクテリウム・イラニカム (*Corynebacterium iranicum*); コリネバクテリウム・セペドニカム (*Corynebacterium sepedonicum*); コリネバクテリウム・ベチコーラ (*Corynebacterium beticola*); コリネバクテリウム・イリシス (*Corynebacterium ilicis*); コリネバクテリウム・ヒュミフェラム (*Corynebacterium humiferum*); コリネバクテリウム・ヒュムリ (*Corynebacterium humuli*); コリネバクテリウム・ヒペルトロフィカンス (*Corynebacterium hypertrophicans*); コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*); コリネバクテリウム・アセトフィラム (*Corynebacterium acetophilum*); コリネバクテリウム・オーランチアカム (*Corynebacterium aurantiacum*); コリネバクテリウム・カルネ (*Corynebacterium callunae*); コリネバクテリウム・シトレウム-モビリス (*Corynebacterium citreum-mobilis*); コリネバクテリウム・エタノールアミノフィラム (*Corynebacterium ethanolaminophilum*); コリネバクテリウム・フラカムファシエンス (*Corynebacterium flaccumfaciens*); コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*); コリネバクテリウム・ヘルクリス (*Corynebacterium herculis*); コリネバクテリウム・ヒドロカルボクラスタス (*Corynebacterium hydrocarboclastus*); コリネバクテリウム・リリウム

(*Corynebacterium lilium*); コリネバクテリウム・ルテウム (*Corynebacterium luteum*); コリネバクテリウム・メディオラナム (*Corynebacterium mediolanum*); コリネバクテリウム・メラセコーラ (*Corynebacterium melassecola*); コリネバクテリウム・ミセトイデス (*Corynebacterium mycetoides*); コリネバクテリウム・ヌビラム (*Corynebacterium nubilum*); コリネバクテリウム・ロセウム (*Corynebacterium roseum*); コリネバクテリウム・サングイニス (*Corynebacterium sanguinis*); アルスロバクター・グロビフォルミス (*Arthrobacter globiformis*); アルスロバクター・シンプレックス (*Arthrobacter simplex*); アルスロバクター・ツメセンス (*Arthrobacter tumescens*); アルスロバクター・シトレウス (*Arthrobacter citreus*); アルスロバクター・テレゲンス (*Arthrobacter terregens*); アルスロバクター・フラベセンス (*Arthrobacter flavescens*); アルスロバクター・デュオデカデイス (*Arthrobacter duodecadis*); アルスロバクター・ルテウス (*Arthrobacter luteus*); アルスロバクター・マリナス (*Arthrobacter marinus*); アルスロバクター・バリアビリス (*Arthrobacter variabilis*); アルスロバクター・ビスコサス (*Arthrobacter viscosus*); アルスロバクター・ポリクロモゲネス (*Arthrobacter polychromogenes*); アルスロバクター・コンソシアタス (*Arthrobacter consociatus*); アルスロバクター・ニコチノボラス (*Arthrobacter nicotinovor*); ブレビバクテリウム・リネンス (*Brevibacterium linens*); ブレビバクテリウム・アセチリカム (*Brevibacterium acetylicum*); ブレビバクテリウム・エリスロゲネス (*Brevibacterium erythrogenes*); ブレビバクテリウム・ヘアリイ (*Brevibacterium healii*); ブレビバクテリウム・リポリチカム (*Brevibacterium lipolyticum*); ブレビバクテリウム・ブルネウム (*Brevibacterium brunneum*); ブレビバクテリウム・フルバム (*Brevibacterium fulvum*); ブレビバクテリウム・フスカム (*Brevibacterium fuscum*); ブレビバクテリウム・ヘルボラム (*Brevibacterium helvolum*); ブレビバクテリウム・イモタム (*Brevibacterium immotum*); ブレビバクテリウム・マリノピスカム (*Brevibacterium marinopiscum*); ブレビバクテリウム・ソシオビバム

(*Brevibacterium sociovium*); ブレビバクテリウム・スタチオニス
(*Brevibacterium stationis*); ブレビバクテリウム・マリス (*Brevibacterium maris*); ブレビバクテリウム・インペリアレ (*Brevibacterium imperiale*); ブレビバクテリウム・インセルタム (*Brevibacterium incertum*); ブレビバクテリウム・インセクチフィリウム (*Brevibacterium insectiphilium*); ブレビバクテリウム・ミヌチフェルラ (*Brevibacterium minutiferula*); ブレビバクテリウム・クアレ (*Brevibacterium quale*); ブレビバクテリウム・テグメンチコラ (*Brevibacterium tegumenticola*); ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*); ブレビバクテリウム・スルフレウム (*Brevibacterium sulfureum*); ブレビバクテリウム・プロトフォルミエ (*Brevibacterium protophormiae*); ブレビバクテリウム・サペルデ (*Brevibacterium saperdae*); ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*); ブレビバクテリウム・インマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*); ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*); ブレビバクテリウム・ロゼウム (*Brevibacterium roseum*); ブレビバクテリウム・サッカロリチカム (*Brevibacterium saccharolyticum*); ブレビバクテリウム・ジバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*); ブレビバクテリウム・ロイチノファガム (*Brevibacterium leucinophagum*); ブレビバクテリウム・イケファシエンス (*Brevibacterium liquefaciens*); ブレビバクテリウム・ペントソ-アラニカム (*Brevibacterium pentoso-alanicum*); ブレビバクテリウム・ペントソ-アミノアシジカム (*Brevibacterium pentoso-aminoacidicum*); ブレビバクテリウム・リチカム (*Brevibacterium lyticum*); ブレビバクテリウム・アルビダム (*Brevibacterium albidum*); ブレビバクテリウム・シトレウム (*Brevibacterium citreum*); ブレビバクテリウム・ルテウム (*Brevibacterium luteum*); ブレビバクテリウム・テストセウム (*Brevibacterium testaceum*); ブレビバクテリウム・プシラム (*Brevibacterium pusillum*); ブレビバクテリウム・アラニカム (*Brevibacterium alanicum*); ブレビバクテリウム・アミノゲネス (*Brevibacterium aminogenes*); ブ

レビバクテリウム・クロモゲネス (*Brevibacterium chromogenes*); ブレビバクテリウム・フリゴリトランス (*Brevibacterium frigoritolerans*); ブレビバクテリウム・ハロトレランス (*Brevibacterium halotolerans*); ブレビバクテリウム・フェルメンタンス (*Brevibacterium fermentans*); ブレビバクテリウム・オキシダンス (*Brevibacterium oxydans*); ミクロバクテリウム・ラクチカム (*Microbacterium lacticum*); ミクロバクテリウム・リケファシエンス (*Microbacterium liquefaciens*); ミクロバクテリウム・フラバム (*Microbacterium flavum*); ミクロバクテリウム・サーモスファクタム (*Microbacterium thermosphactum*); セルロモナス・フラビゲナ (*Cellulomonas flavigena*); セルロモナス・アシズラ (*Cellulomonas acidula*); セルロモナス・オーロゲナ (*Cellulomonas aurogena*); セルロモナス・ガルバ (*Cellulomonas galba*); セルロモナス・プシラ (*Cellulomonas pusilla*); クルシア・ゾフイ (*Kurthia zopfii*), クルシア・バリアビリス (*Kurthia variabilis*); クルシア・ベソニイ (*Kurthia bessonii*); プロピオニバクテリウム・フリーデンレイチイ (*Propionibacterium freudenreichii*); プロピオニバクテリウム・ソエニイ (*Propionibacterium thoenii*); プロピオニバクテリウム・アシジ-プロピオニシ (*Propionibacterium acidipropionici*); プロピオニバクテリウム・ジェンセニイ (*Propionibacterium jensenii*); プロピオニバクテリウム・アビダム (*Propionibacterium avidum*); プロピオニバクテリウム・アクネス (*Propionibacterium acnes*); プロピオニバクテリウム・アクネスタイプ II (*Propionibacterium acnes* Type II); プロピオニバクテリウム・リンフォフィラム (*Propionibacterium lymphophilum*); プロピオニバクテリウム・グラヌロサム (*Propionibacterium granulosum*); ユーコバクテリウム・フェガンズ (*Eucobacterium foedans*); ユーコバクテリウム・アラクトリチカム (*Eucobacterium alactolyticum*); ユーコバクテリウム・レクター (*Eucobacterium rectale*); ユーコバクテリウム・リモサム (*Eucobacterium limosum*); ユーコバクテリウム・ルミナンチウム (*Eucobacterium ruminantium*); ユーコバクテリウム・サブレウム (*Eucobacterium saburreum*); ユーコバクテリウ

ム・ブダイイ (*Eucobacterium budayi*); ユーコバクテリウム・ニトリトゲネス (*Eucobacterium nitritogenes*); ユーコバクテリウム・ベントリオサム (*Eucobacterium ventriosum*); ユーコバクテリウム・ムチフォルメ (*Eucobacterium mutiforme*); ユーコバクテリウム・シリンドロイデス (*Eucobacterium cylindroids*); ユーコバクテリウム・モニリフォルメ (*Eucobacterium moniliforme*); ユーコバクテリウム・トルツオサム (*Eucobacterium tortuosum*); ユーコバクテリウム・セルロソルベンス (*Eucobacterium cellulosolvans*); ユーコバクテリウム・コンベシイ (*Eucobacterium combesii*); ユーコバクテリウム・テヌエ (*Eucobacterium tenue*); ユーコバクテリウム・フィシカテナ (*Eucobacterium fissicatena*); ユーコバクテリウム・コントルタム (*Eucobacterium contortum*); ユーコバクテリウム・エロファシエンス (*Eucobacterium aerofaciens*); ユーコバクテリウム・レンタム (*Eucobacterium lentum*); ユーコバクテリウム・エンドカルジチジス (*Eucobacterium endocarditidis*); ユーコバクテリウム・ヘルミンソイデス (*Eucobacterium helminthoides*); ユーコバクテリウム・シュードトルツオサム (*Eucobacterium pseudotortuosum*); ユーコバクテリウム・オブスチイ (*Eucobacterium obstii*); ユーコバクテリウム・エシリカム (*Eucobacterium ethylicum*); ユーコバクテリウム・ヘルウィギエ (*Eucobacterium helwigiae*); ユーコバクテリウム・ウレオリチカム (*Eucobacterium ureolyticum*); ユーコバクテリウム・パルバム (*Eucobacterium parvum*); アクチノマイセス・ボビス (*Actinomyces bovis*); アクチノマイセス・オドントリチカス (*Actinomyces odontolyticus*); アクチノマイセス・イスレリイ (*Actinomyces israelii*); アクチノマイセス・ネスルンジ (*Actinomyces naeslundii*); アクチノマイセス・ビスコサス (*Actinomyces viscosus*); アクチノマイセス・エリクソニイ (*Actinomyces eriksonii*); アクチノマイセス・フミフェラス (*Actinomyces humiferus*); アクチノマイセス・スイス (*Actinomyces suis*); アラクニア・プロピオニカ (*Arachnia propionica*); ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*); ビフィドバクテリウム・アドレセンチス (*Bifidobacterium adolescentis*); ビフィドバクテリウム・インフ

アンチス (*Bifidobacterium infantis*); ビフィドバクテリウム・ブレベ (*Bifidobacterium breve*); ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*); ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*); ビフィドバクテリウム・サーモフィルム (*Bifidobacterium thermophilum*); ビフィドバクテリウム・スイス (*Bifidobacterium suis*); ビフィドバクテリウム・アステロイデス (*Bifidobacterium asteroides*); ビフィドバクテリウム・インジカム (*Bifidobacterium indicum*); ビフィドバクテリウム・コリネフォルメ (*Bifidobacterium coryneforme*); バクテリオネマ・マトルチョチイ (*Bacterionema matruchotii*); ロシア・デントカリオサ (*Rothia dentocariosa*); マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*); マイコバクテリウム・ミクロチ (*Mycobacterium microti*); マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*); マイコバクテリウム・ボビス・BCG (*Mycobacterium bovis* BCG); マイコバクテリウム・アフリカナム (*Mycobacterium africanum*); マイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*); マイコバクテリウム・マリナム (*Mycobacterium marinum*); マイコバクテリウム・シミエ (*Mycobacterium simiae*); マイコバクテリウム・ガストリ (*Mycobacterium gastri*); マイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム (*Mycobacterium nonchromogenicum*); マイコバクテリウム・テレ (*Mycobacterium terrae*); マイコバクテリウム・トリビアレ (*Mycobacterium triviale*); マイコバクテリウム・ゴルドネ (*Mycobacterium gordonae*); マイコバクテリウム・スクロフェラセウム (*Mycobacterium scrofulaceum*); マイコバクテリウム・パラフィニカム (*Mycobacterium paraffinicum*); マイコバクテリウム・イントラセルラエ (*Mycobacterium intracellulare*); マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*); マイコバクテリウム・ゼノピ (*Mycobacterium xenopi*); マイコバクテリウム・ウルセランス (*Mycobacterium ulcerans*); マイコバクテリウム・フレイ (*Mycobacterium phlei*); マイコバクテリウム・バケ (*Mycobacterium vaccae*); マイコバクテリウム・ジエルンホフェリ (*Mycobacterium diernhoferi*); マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*); マイコバクテリ

ウム・サムノフェオス (*Mycobacterium thamnophaeos*); マイコバクテリウム・フラベセンス (*Mycobacterium flavescens*); マイコバクテリウム・フォルツイタム (*Mycobacterium fortuitum*); マイコバクテリウム・ペレグリナム (*Mycobacterium peregrinum*); マイコバクテリウム・ケロネイ (*Mycobacterium chelonei*); マイコバクテリウム・パラツベルクロシス (*Mycobacterium paratuberculosis*); マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*); マイコバクテリウム・レプレムリウム (*Mycobacterium lepraemurium*); フランキア・アルニ (*Frankia alni*); フランキア・エレアグニ (*Frankia elaeagni*); フランキア・ジスカリエ (*Frankia discariae*); フランキア・セアノシ (*Frankia ceanothi*); フランキア・コリアリエ (*Frankia coriariae*); フランキア・ドリアジス (*Frankia dryadis*); フランキア・プルシエ (*Frankia purshiae*); フランキア・セルコカルピ (*Frankia cercocarpi*); フランキア・ブルンコルスチイ (*Frankia brunchorstii*); フランキア・カスアリネ (*Frankia casuarinae*); アクチノプラネス・フィリピンシス (*Actinoplanes philippinensis*); アクチノプラネス・アルメニアカス (*Actinoplanes armeniacus*); アクチノプラネス・ミズーリエンシス (*Actinoplanes missouriensis*); アクチノプラネス・ウタヘンシス (*Actinoplanes utahensis*); スピリロスポラ・アルビダ (*Spirillospora albida*); ストレプトスポランギウム・ロゼウム (*Streptosporangium roseum*); ストレプトスポランギウム・ブルガレ (*Streptosporangium vulgare*); ストレプトスポランギウム・アメシストゲネス (*Streptosporangium amethystogenes*); ストレプトスポランギウム・シュードブルガレ (*Streptosporangium pseudovulgare*); ストレプトスポランギウム・ノンジアスタチカム (*Streptosporangium nondiastaticum*); ストレプトスポランギウム・ロンギスポラム (*Streptosporangium longisporum*); ストレプトスポランギウム・ビリドグリセウム (*Streptosporangium viridogriseum*); ストレプトスポランギウム・アルバム (*Streptosporangium album*); ストレプトスポランギウム・アルビダム (*Streptosporangium albidum*); ストレプトスポランギウム・ビリジアルバム (*Streptosporangium viridialbum*); ストレプトスポランギウム・ルブラム

(*Streptosporangium rubrum*); アモルホスホランギウム・オーランチカラー
(*Amorphosporangium auranticolor*); アンブラリエラ・レグラリス
(*Ampullariella regularis*); アンブラリエラ・カンパヌラタ (*Ampullariella
campanulata*); アンブラリエラ・ロバタ (*Ampullariella lobata*); アンブラリエ
ラ・ジギタータ (*Ampullariella digitata*); ピリメリア・テレバサ (*Pilimelia
terevasa*); ピリメリア・アヌラタ (*Pilimelia anulata*); プラノモノスポラ・パロ
ントスポラ (*Planomonospora parontospora*); プラノモノスポラ・ベネズエレンシ
ス (*Planomonospora venezuelensis*); プラノビスポラ・ロンギスポラ
(*Planobispora longispora*); プラノビスポラ・ロゼア (*Planobispora rosea*); ダク
チロスポランギウム・オーランチアカム (*Dactylosporangium aurantiacum*); ダク
チロスポランギウム・タイランデンセ (*Dactylosporangium thailandense*); デルマ
トフィルス・コンゴレンシス (*Dermatophilus congolensis*); ゲオデルマトフィル
ス・オブスクラス (*Geodermatophilus obscurus*); ノカルジア・ファルシニカ
(*Nocardia farcinica*); ノカルジア・オチチダス-カビアラム (*Nocardia
otitidis-caviarum*); ノカルジア・ブラシリエンシス (*Nocardia brasiliensis*);
ノカルジア・アステロイデス (*Nocardia asteroides*); ノカルジア・トランスバレン
シス (*Nocardia transvalensis*); ノカルジア・フォルミケ (*Nocardia formicae*);
ノカルジア・ケリアカ (*Nocardia coeliaca*); ノカルジア・ポリクロモゲネス
(*Nocardia polychromogenes*); ノカルジア・パラフィネ (*Nocardia paraffinae*);
ノカルジア・ペトロレオフィラ (*Nocardia petroleophila*); ノカルジア・サツルネ
ア (*Nocardia saturnea*); ノカルジア・クロイシイ (*Nocardia kuroishii*); ノカルジ
ア・ルゴサ (*Nocardia rugosa*); ノカルジア・ロドニイ (*Nocardia rhodnii*); ノカル
ジア・バシニイ (*Nocardia vaccinii*); ノカルジア・ミニマ (*Nocardia minima*); ノ
カルジア・ブラックウェリイ (*Nocardia blackwellii*); ノカルジア・コンボルタ
(*Nocardia convoluta*); ノカルジア・セルランス (*Nocardia cellulans*); ノカルジ
ア・ルテア (*Nocardia lutea*); ノカルジア・グロベルラ (*Nocardia globerula*); ノ
カルジア・ルプロペルチンクタ (*Nocardia rubropertincta*); ノカルジア・コラリ

ナ (*Nocardia corallina*); ノカルジア・サルモニカラー (*Nocardia salmonicolor*);
ノカルジア・ルブラ (*Nocardia rubra*); ノカルジア・オパカ (*Nocardia opaca*); ノ
カルジア・カルカレア (*Nocardia calcarea*); ノカルジア・レストリクタ (*Nocardia*
restricta); ノカルジア・エリスロポリス (*Nocardia erythropolis*); ノカルジア・
マリナ (*Nocardia marina*); ノカルジア・アトランチカ (*Nocardia atlantica*); ノカ
ルジア・エロコロニゲネス (*Nocardia aerocolonigenes*); ノカルジア・オーランチ
ア (*Nocardia aurantia*); ノカルジア・ブタニカ (*Nocardia butanica*); ノカルジア・
ダソンビレイ (*Nocardia dassonvillei*); ノカルジア・ヒスチダンス (*Nocardia*
histidans); ノカルジア・マズレ (*Nocardia madurae*); ノカルジア・ネオオパカ
(*Nocardia neoopaca*); ノカルジア・ペレグリノ (*Nocardia pellegrino*); ノカルジ
ア・ペレチエリ (*Nocardia pelletieri*); ノカルジア・シルボドリフェラ (*Nocardia*
sylvodorifera); ノカルジア・ツルバタ (*Nocardia turbata*); ノカルジア・テヌイ
ス (*Nocardia tenuis*); ノカルジア・バリアビリス (*Nocardia variabilis*); シュー
ドノカルジア・サーモフィラ (*Pseudonocardia thermophila*); シュードノカルジ
ア・スピノーザ (*Pseudonocardia spinosa*); ストレプトマイセス・アルボロンガス
(*Streptomyces albolongus*); ストレプトマイセス・ビリダリス (*Streptomyces*
viridaris); ストレプトマイセス・アルボ-ニゲル (*Streptomyces albo-niger*); ス
トレプトマイセス・アルボスポレウス (*Streptomyces albosporus*); ストレプトマ
イセス・アルボビナセウス (*Streptomyces albovinaceus*); ストレプトマイセス・
オーレオサークラタス (*Streptomyces aureocirculatus*); ストレプトマイセス・バ
アルネンシス (*Streptomyces baarnensis*); ストレプトマイセス・クラビフェル
(*Streptomyces clavifer*); ストレプトマイセス・ガルチエリ (*Streptomyces*
galtieri); ストレプトマイセス・ボビリ (*Streptomyces bobili*); ストレプトマイ
セス・ロンギスポロルベル (*Streptomyces longispororuber*); ストレプトマイセ
ス・ロンギスポラス (*Streptomyces longisporus*); ストレプトマイセス・ヘルベウ
ス (*Streptomyces herbeus*); ストレプトマイセス・アルボファシエンス
(*Streptomyces albofaciens*); ストレプトマイセス・アルバス (*Streptomyces*

albus); ストレプトマイセス・アルバス亜種ブルネオミシニ (*Streptomyces albus* subsp. *bruneomycini*); ストレプトマイセス・アルバス亜種パソシジカス (*Streptomyces albus* subsp. *pathocidicus*); ストレプトマイセス・アルムキスチイ (*Streptomyces almquistii*); ストレプトマイセス・アミノフィラス (*Streptomyces aminophilus*); ストレプトマイセス・カカオイ (*Streptomyces cacaoi*); ストレプトマイセス・クレストミセチカス (*Streptomyces chrestomyceticus*); ストレプトマイセス・フロクラス (*Streptomyces flocculus*); ストレプトマイセス・ギブソニイ (*Streptomyces gibsonii*); ストレプトマイセス・ヘルベセンス (*Streptomyces herbescens*); ストレプトマイセス・イオドフォルミカス (*Streptomyces iodoformicus*); ストレプトマイセス・オクラセイスクレロチカス (*Streptomyces ochraceiscleroticus*); ストレプトマイセス・ランゴオン (*Streptomyces rangoon*); ストレプトマイセス・リモサス (*Streptomyces rimosus*); ストレプトマイセス・リモサス亜種パロモミシナス (*Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus*); ストレプトマイセス・リモサス亜種シュードベルチシラタス (*Streptomyces rimosus* subsp. *pseudoverticillatus*); ストレプトマイセス・スピロベルチシラタス (*Streptomyces spiroverticillatus*); ストレプトマイセス・サブフラバス (*Streptomyces subflavus*); ストレプトマイセス・バルソビエンシス (*Streptomyces varsoviensis*); ストレプトマイセス・ザンソリチカス (*Streptomyces xantholiticus*); ストレプトマイセス・アルバス亜種フンガタス (*Streptomyces albus* subsp. *fungatus*); ストレプトマイセス・ヒドロゲナンス (*Streptomyces hydrogenans*); ストレプトマイセス・ベンダルガス (*Streptomyces vendargus*); ストレプトマイセス・アクロモゲネス (*Streptomyces achromogenes*); ストレプトマイセス・アンチビオチカス (*Streptomyces antibioticus*); ストレプトマイセス・ビキニエンシス (*Streptomyces bikiniensis*); ストレプトマイセス・カカオイ亜種アソエンシス (*Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis*); ストレプトマイセス・シネレオルバー (*Streptomyces cinereoruber*); ストレプトマイセス・シネレオルバー亜種フルクトフェルメンタンス (*Streptomyces cinereoruber*

subsp. fructofermentans); ストレプトマイセス・シリンドロスポラス亜種ピセウス (Streptomyces cylindrosporus subsp. piceus); ストレプトマイセス・エデレンシス (Streptomyces ederensis); ストレプトマイセス・フルボビオラセウス (Streptomyces fulvoviolaceus); ストレプトマイセス・フルボビリジス (Streptomyces fulvoviridis); ストレプトマイセス・ガルドネリ (Streptomyces gardneri); ストレプトマイセス・グロボサス (Streptomyces globosus); ストレプトマイセス・グリセオルビギノサス (Streptomyces griseorubiginosus); ストレプトマイセス・ハーバリカラー (Streptomyces herbaricolor); ストレプトマイセス・インジゴフェラス (Streptomyces indigoferus); ストレプトマイセス・リトモシジニ (Streptomyces litmocidini); ストレプトマイセス・ナルボネンシス (Streptomyces narbonensis); ストレプトマイセス・ナシュビレンシス (Streptomyces nashvillensis); ストレプトマイセス・ノボリトエンシス (Streptomyces noboritoensis); ストレプトマイセス・ファエオプルプレウス (Streptomyces phaeopurpureus); ストレプトマイセス・プルペオフアスカス (Streptomyces purpeofuscus); ストレプトマイセス・ショウドエンシス (Streptomyces showdoensis); ストレプトマイセス・タナシエンシス (Streptomyces tanashiensis); ストレプトマイセス・ビオラセオレクタス (Streptomyces violaceorectus); ストレプトマイセス・ザオミセチカス (Streptomyces zaomyceticus); ストレプトマイセス・アブラビエンシス (Streptomyces aburaviensis); ストレプトマイセス・ケルレウス (Streptomyces caeruleus); ストレプトマイセス・カテヌレ (Streptomyces catenulae); ストレプトマイセス・クリソマラス亜種フミガタス (Streptomyces chrysomallus subsp. fumigatus); ストレプトマイセス・ザンソシジカス (Streptomyces xanthocidicus); ストレプトマイセス・アクロモゲネス亜種ルブラジリス (Streptomyces achromogenes subsp. rubradiris); ストレプトマイセス・アナンジイ (Streptomyces anandii); ストレプトマイセス・オーランチオグリセウス (Streptomyces aurantiogriseus); ストレプトマイセス・ボビリ亜種スポリフィカ

ンス (*Streptomyces bobili* subsp. *sporificans*); ストレプトマイセス・シネクロ
ロモゲネス (*Streptomyces cinerochromogenes*); ストレプトマイセス・シラツス
(*Streptomyces cirratus*); ストレプトマイセス・コリナス (*Streptomyces*
collinus); ストレプトマイセス・ユーリセルマス (*Streptomyces eurythermus*);
ストレプトマイセス・ガルバス (*Streptomyces galbus*); ストレプトマイセス・ガ
リレウス (*Streptomyces galilaeus*); ストレプトマイセス・グリセオルバー
(*Streptomyces griseoruber*); ストレプトマイセス・グリセオスポレウス
(*Streptomyces griseosporus*); ストレプトマイセス・ハイグロスコピクス亜種オ
サマイセチカス (*Streptomyces hygrosopicus* subsp. *ossamyceticus*); ストレプ
トマイセス・クルサノビイ (*Streptomyces kurssanovii*); ストレプトマイセス・ル
テオグリセウス (*Streptomyces luteogriseus*); ストレプトマイセス・マサスポレ
ウス (*Streptomyces massasporeus*); ストレプトマイセス・ミラビリス
(*Streptomyces mirabilis*); ストレプトマイセス・マルチスピラリス
(*Streptomyces multispiralis*); ストレプトマイセス・ナガニシイ (*Streptomyces*
naganishii); ストレプトマイセス・ネヤガワエンシス (*Streptomyces*
neyagawaensis); ストレプトマイセス・ノジリエンシス (*Streptomyces*
nojiriensis); ストレプトマイセス・オリボクロモゲネス (*Streptomyces*
olivochromogenes); ストレプトマイセス・フェオファシエンシス (*Streptomyces*
phaeofaciens); ストレプトマイセス・プルベラセウス (*Streptomyces*
pulveraceus); ストレプトマイセス・ラメウス (*Streptomyces rameus*); ストレプ
トマイセス・レジストマイシフィカス (*Streptomyces resistomycificus*); ストレプ
トマイセス・リシリエンシス (*Streptomyces rishiriensis*); ストレプトマイセ
ス・サーモビオラセウス (*Streptomyces thermoviolaceus*); ストレプトマイセス・
ビオラセオクロモゲネス (*Streptomyces violaceochromogenes*); ストレプトマイ
セス・アフガニエンシス (*Streptomyces afghaniensis*); ストレプトマイセス・ア
レネ (*Streptomyces arenae*); ストレプトマイセス・アトロシアネウス
(*Streptomyces atrocyaneus*); ストレプトマイセス・クロモフスカス

(*Streptomyces chromofuscus*); ストレプトマイセス・ダルハネンシス (*Streptomyces durhamensis*); ストレプトマイセス・エキナタス (*Streptomyces echinatus*); ストレプトマイセス・フィリピンシス (*Streptomyces filipinensis*); ストレプトマイセス・フィンブリアタス (*Streptomyces fimbriatus*); ストレプトマイセス・グリセオクロモゲネス (*Streptomyces griseochromogenes*); ストレプトマイセス・イアキラス (*Streptomyces iakyrus*); ストレプトマイセス・ルセンシス (*Streptomyces lucensis*); ストレプトマイセス・マラキトフスカス (*Streptomyces malachitofuscus*); ストレプトマイセス・マラキトレクタス (*Streptomyces malachitorectus*); ストレプトマイセス・ピロサス (*Streptomyces pilosus*); ストレプトマイセス・アルビドファスカス (*Streptomyces albidofuscus*); ストレプトマイセス・アルボグリセオラス (*Streptomyces albogriseolus*); ストレプトマイセス・アンボファシエンス (*Streptomyces ambofaciens*); ストレプトマイセス・アンソシアニカス (*Streptomyces anthocyanicus*); ストレプトマイセス・アンチマイコチカス (*Streptomyces antimycoticus*); ストレプトマイセス・アルゲンテオラス (*Streptomyces argenteolus*); ストレプトマイセス・アトラタス (*Streptomyces atratus*); ストレプトマイセス・オーレオファシエンス (*Streptomyces aureofaciens*); ストレプトマイセス・アベラネウス (*Streptomyces avellaneus*); ストレプトマイセス・ケシウス (*Streptomyces caesius*); ストレプトマイセス・カルノサス (*Streptomyces carnosus*); ストレプトマイセス・チベンシス (*Streptomyces chibaensis*); ストレプトマイセス・ケレセンス (*Streptomyces coelescens*); ストレプトマイセス・ケリカラー亜種アクロウス (*Streptomyces coelicolor* subsp. *achrous*); ストレプトマイセス・ケリカラー亜種ケリコファース (*Streptomyces coelicolor* subsp. *coelicofers*); ストレプトマイセス・ケリカラー亜種ケリコラタス (*Streptomyces coelicolor* subsp. *coelicolatus*); ストレプトマイセス・ケリカラー亜種ケリコバリアンス (*Streptomyces coelicolor* subsp. *coelicovarians*); ストレプトマイセス・コルコルシイ (*Streptomyces*

corchorusii); ストレプトマイセス・シアノゲナス (*Streptomyces cyanogenus*);
ストレプトマイセス・ジアスタチカス 亜種 アルデシアカス (*Streptomyces*
diastaticus subsp. *ardesiacus*); ストレプトマイセス・ジアスタクロモゲネス
亜種 ブラカス (*Streptomyces diastatochromogenes* subsp. *bracus*); ストレプトマ
イセス・エンダス (*Streptomyces endus*); ストレプトマイセス・エルンペンス
(*Streptomyces erumpens*); ストレプトマイセス・グリセオオーランチアカス
(*Streptomyces griseoaurantiacus*); ストレプトマイセス・グリセオフスカス
(*Streptomyces griseofuscus*); ストレプトマイセス・グリセオサフスカス
(*Streptomyces griseolosuffuscus*); ストレプトマイセス・グリセオルテウス
(*Streptomyces griseoluteus*); ストレプトマイセス・グリセウス 亜種 ジフィシリ
ス (*Streptomyces griseus* subsp. *difficilis*); ストレプトマイセス・ヒュミダス
(*Streptomyces humidus*); ストレプトマイセス・ヒグロスコピカス (*Streptomyces*
hygroscopicus); ストレプトマイセス・ヒグロスコピクス 亜種 アンガストマイセチ
カス (*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus*); ストレプトマイセ
ス・ヒグロスコピカス 亜種 デコイカス (*Streptomyces hygroscopicus* subsp.
decoyicus); ストレプトマイセス・ヒグロスコピウス 亜種 グレボサス
(*Streptomyces hygroscopius* subsp. *glebosus*); ストレプトマイセス・リバニ
(*Streptomyces libani*); ストレプトマイセス・リバニ 亜種 ルファス (*Streptomyces*
libani subsp. *rufus*); ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces*
lividans); ストレプトマイセス・ルシタナス (*Streptomyces lusitanus*); ストレ
プトマイセス・リジカス (*Streptomyces lydicus*); ストレプトマイセス・メラノス
ポロファシエンス (*Streptomyces melanosporofaciens*); ストレプトマイセス・ミ
シオネンシス (*Streptomyces misionensis*); ストレプトマイセス・ムリナス
(*Streptomyces murinus*); ストレプトマイセス・ムタビリス (*Streptomyces*
mutabilis); ストレプトマイセス・ニグレセンス (*Streptomyces nigrescens*); スト
レプトマイセス・ノドサス (*Streptomyces nodosus*); ストレプトマイセス・ノガラ
テル (*Streptomyces nogalater*); ストレプトマイセス・オリバセイスクレロチカス

(*Streptomyces olivaceiscleroticus*); ストレプトマイセス・オリバセオビリジス
(*Streptomyces olivaceoviridis*); ストレプトマイセス・オリバセウス
(*Streptomyces olivaceus*); ストレプトマイセス・パルバラス (*Streptomyces*
parvullus); ストレプトマイセス・プラテンシス (*Streptomyces platensis*); スト
レプトマイセス・プリカタス (*Streptomyces plicatus*); ストレプトマイセス・ポ
オネンシス (*Streptomyces poonensis*); ストレプトマイセス・サモチカス
(*Streptomyces psammoticus*); ストレプトマイセス・プルプロゲネイスクレロチカ
ス (*Streptomyces purpurogeneiscleroticus*); ストレプトマイセス・レシフェニス
(*Streptomyces recifenis*); ストレプトマイセス・ロケイ (*Streptomyces rochei*);
ストレプトマイセス・ロクゲンシス (*Streptomyces rokugoensis*); ストレプトマイ
セス・ロゼオジアスタチカス (*Streptomyces roseodiastaticus*); ストレプトマイ
セス・ルトゲルセンシス亜種カステラレンセ (*Streptomyces rutgersensis* subsp.
castelarensis); ストレプトマイセス・サヤメンシス (*Streptomyces sayamaensis*);
ストレプトマイセス・センダイエンシス (*Streptomyces sendaiensis*); ストレプト
マイセス・シオヤエンシス (*Streptomyces sioyaensis*); ストレプトマイセス・テ
ンデ (*Streptomyces tendae*); ストレプトマイセス・サーモブルガリス
(*Streptomyces thermovulgaris*); ストレプトマイセス・トリカラー (*Streptomyces*
tricolor); ストレプトマイセス・ツベルシジカス (*Streptomyces tubercidicus*);
ストレプトマイセス・ツメマセランス (*Streptomyces tumemacerans*); ストレプト
マイセス・バスタス (*Streptomyces vastus*); ストレプトマイセス・ビオラセオラ
タス (*Streptomyces violaceolatus*); ストレプトマイセス・ビオラセウス-ニゲル
(*Streptomyces violaceus-niger*); ストレプトマイセス・ビオラセウス-ルバー
(*Streptomyces violaceus-ruber*); ストレプトマイセス・ビリジファシエンス
(*Streptomyces viridifaciens*); ストレプトマイセス・アトロオリバセウス
(*Streptomyces atroolivaceus*); ストレプトマイセス・シアノカラー
(*Streptomyces cyanocolor*); ストレプトマイセス・グラミノファシエンス
(*Streptomyces graminofaciens*); ストレプトマイセス・グリセオプラナス

(*Streptomyces griseoplanus*); ストレプトマイセス・アルバダンカス
(*Streptomyces albaduncus*); ストレプトマイセス・アルボスピナス (*Streptomyces*
albospinus); ストレプトマイセス・アルバラス (*Streptomyces albulus*); ストレ
プトマイセス・アルチオチカス (*Streptomyces althioticus*); ストレプトマイセ
ス・アラビカス (*Streptomyces arabicus*); ストレプトマイセス・アトロオリバセ
ウス亜種ムトマイシニ (*Streptomyces atroolivaceus* subsp. *mutomycini*); ストレ
プトマイセス・カナス (*Streptomyces canus*); ストレプトマイセス・チャタノオゲ
ンシス (*Streptomyces chattanoogensis*); ストレプトマイセス・クロロビエンス
(*Streptomyces chlorobiens*); ストレプトマイセス・カスピドスポラス
(*Streptomyces cuspidosporus*); ストレプトマイセス・ガンシジカス
(*Streptomyces gancidicus*); ストレプトマイセス・グリセオフラバス
(*Streptomyces griseoflavus*); ストレプトマイセス・グリセオインカルナタス
(*Streptomyces griseoincarnatus*); ストレプトマイセス・グリセオルベンス
(*Streptomyces griseorubens*); ストレプトマイセス・マクロスポレウス
(*Streptomyces macrosporeus*); ストレプトマイセス・マラキチカス (*Streptomyces*
malachiticus); ストレプトマイセス・マテンシス (*Streptomyces matensis*); スト
レプトマイセス・ナーセイ (*Streptomyces noursei*); ストレプトマイセス・オリボ
ビリジス (*Streptomyces olivoviridis*); ストレプトマイセス・シュードグリセオ
ラス (*Streptomyces pseudogriseolus*); ストレプトマイセス・ルビギノサス
(*Streptomyces rubiginosus*); ストレプトマイセス・スパルソゲネス
(*Streptomyces sparsogenes*); ストレプトマイセス・ビリジビオラセウス
(*Streptomyces viridiviolaceus*); ストレプトマイセス・ビリド-ジアスタチカス
(*Streptomyces virido-diastaticus*); ストレプトマイセス・カルバス
(*Streptomyces calvus*); ストレプトマイセス・シアノアルバス (*Streptomyces*
cyanoalbus); ストレプトマイセス・フィンライ (*Streptomyces finlayi*); ストレ
プトマイセス・フラベオラス (*Streptomyces flaveolus*); ストレプトマイセス・ゲイ
シリエンシス (*Streptomyces geysiriensis*); ストレプトマイセス・ハービフェリ

ス (*Streptomyces herbiferis*); ストレプトマイセス・パクタム (*Streptomyces pactum*); ストレプトマイセス・アキテンシス (*Streptomyces akitaensis*); ストレプトマイセス・アキヨシエンシス (*Streptomyces akiyoshiensis*); ストレプトマイセス・アラノシニカス (*Streptomyces alanosinicus*); ストレプトマイセス・アルビダス亜種インベルテンス (*Streptomyces albidus* subsp. *invertens*); ストレプトマイセス・アルボクロモゲネス (*Streptomyces albochromogenes*); ストレプトマイセス・アンソクロモゲネス (*Streptomyces ansochromogenes*); ストレプトマイセス・アンソクロモゲネス亜種パレンス (*Streptomyces ansochromogenes* subsp. *pallens*); ストレプトマイセス・アビジニイ (*Streptomyces avidinii*); ストレプトマイセス・カルシノマイシカス (*Streptomyces carcinomycicus*); ストレプトマイセス・カスタネグロビスポラス (*Streptomyces castaneglobisporus*); ストレプトマイセス・カスタネウス (*Streptomyces castaneus*); ストレプトマイセス・シアノフラバス (*Streptomyces cyanoflavus*); ストレプトマイセス・ジャカルテンシス (*Streptomyces djakartensis*); ストレプトマイセス・エリスロクロモゲネス亜種ナルトエンシス (*Streptomyces erythrochromogenes* subsp. *narutoensis*); ストレプトマイセス・グロメロクロモゲネス (*Streptomyces glomerochromogenes*); ストレプトマイセス・グリシナス (*Streptomyces griseus*); ストレプトマイセス・ハラノマキエンシス (*Streptomyces haranomachiensis*); ストレプトマイセス・ヒグロスタチカス (*Streptomyces hygrostaticus*); ストレプトマイセス・インスラタス (*Streptomyces insulatus*); ストレプトマイセス・インベルソクロモゲネス (*Streptomyces inversochromogenes*); ストレプトマイセス・キタズワエンシス (*Streptomyces kitazuwaensis*); ストレプトマイセス・マリエンシス (*Streptomyces mariensis*); ストレプトマイセス・ミヌチスクレロチカス (*Streptomyces minutiscleroticus*); ストレプトマイセス・ミタカエンシス (*Streptomyces mitakaensis*); ストレプトマイセス・ニグログリセオラス (*Streptomyces nigrogriseolus*); ストレプトマイセス・オガエンシス (*Streptomyces ogaensis*); ストレプトマイセス・ピエダデンシス (*Streptomyces*

piedadensis); ストレプトマイセス・レゲンシス (*Streptomyces regensis*); ストレプトマイセス・ロベフスカス (*Streptomyces robefuscus*); ストレプトマイセス・ロベウス (*Streptomyces robeus*); ストレプトマイセス・ロバストラス (*Streptomyces robustus*); ストレプトマイセス・ロゼオグリセオラス (*Streptomyces roseogriseolus*); ストレプトマイセス・ロゼオグリセウス (*Streptomyces roseogriseus*); ストレプトマイセス・サハキロイ (*Streptomyces sahachiroi*); ストレプトマイセス・セノエンシス (*Streptomyces senoensis*); ストレプトマイセス・タナシエンシス亜種セファロマイセチカス (*Streptomyces tanashiensis* subsp. *cephalomyceticus*); ストレプトマイセス・サーモニトリフィカンス (*Streptomyces thermonitrificans*); ストレプトマイセス・サーモビオラセウス亜種アピンゲンス (*Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *apingens*); ストレプトマイセス・ビリドニゲル (*Streptomyces viridoniger*); ストレプトマイセス・ウェラエンシス (*Streptomyces werraensis*); ストレプトマイセス・アルボフラバス (*Streptomyces alboflavus*); ストレプトマイセス・バシラリス (*Streptomyces bacillaris*); ストレプトマイセス・カボレンシス (*Streptomyces cavourensis*); ストレプトマイセス・シアネオフラスカタス (*Streptomyces cyaneofuscatus*); ストレプトマイセス・ファルビシマス (*Streptomyces fulvissimus*); ストレプトマイセス・グリセオブルネウス (*Streptomyces griseobrunneus*); ストレプトマイセス・ミシガネンシス (*Streptomyces michiganensis*); ストレプトマイセス・ツシマエンシス (*Streptomyces tsusimaensis*); ストレプトマイセス・ザンソクロモゲナス (*Streptomyces xanthochromogenus*); ストレプトマイセス・アルビドフラバス (*Streptomyces albidoflavus*); ストレプトマイセス・アルボビリジス (*Streptomyces alboviridis*); ストレプトマイセス・アヌラタス (*Streptomyces anulatus*); ストレプトマイセス・バジアス (*Streptomyces badius*); ストレプトマイセス・カリフォルニカス (*Streptomyces californicus*); ストレプトマイセス・カネセンス (*Streptomyces canescens*); ストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces*

celluloflavus); ストレプトマイセス・セルローサ (*Streptomyces cellulosae*);
ストレプトマイセス・チャンパバチイ (*Streptomyces champavatii*); ストレプトマ
イセス・クリソマラス (*Streptomyces chrysomallus*); ストレプトマイセス・シト
レオフルオレセンス (*Streptomyces citreofluorescens*); ストレプトマイセス・ケ
リカラー (*Streptomyces coelicolor*); ストレプトマイセス・フェレウス
(*Streptomyces felleus*); ストレプトマイセス・フィミカリウス (*Streptomyces*
fimicarius); ストレプトマイセス・フロリデ (*Streptomyces floridae*); ストレプ
トマイセス・フルオレセンス (*Streptomyces fluorescens*); ストレプトマイセス・
グロビスポラス (*Streptomyces globisporus*); ストレプトマイセス・グロビスポラ
ス亜種コーカシカス (*Streptomyces globisporus* subsp. *caucasicus*); ストレプト
マイセス・グロビスポラス亜種フラボファスカス (*Streptomyces globisporus*
subsp. *flavofuscus*); ストレプトマイセス・グロビスポラス亜種ブルガリス
(*Streptomyces globisporus* subsp. *vulgaris*); ストレプトマイセス・グーゲロチ
イ (*Streptomyces gougerotii*); ストレプトマイセス・グリセイナス (*Streptomyces*
griseinus); ストレプトマイセス・グリセオロアルバス (*Streptomyces*
griseoloalbus); ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*); スト
レプトマイセス・グリセウス亜種アルファ (*Streptomyces griseus* subsp. *alpha*);
ストレプトマイセス・グリセウス亜種クレトサス (*Streptomyces griseus* subsp.
cretosus); ストレプトマイセス・グリセウス亜種ソルビファシエンス
(*Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*); ストレプトマイセス・インテルメ
ジウス (*Streptomyces intermedius*); ストレプトマイセス・カナマイセチカス
(*Streptomyces kanamyceticus*); ストレプトマイセス・レボリス (*Streptomyces*
levoris); ストレプトマイセス・リモサス (*Streptomyces limosus*); ストレプトマ
イセス・リップマニイ (*Streptomyces lipmanii*); ストレプトマイセス・ミクロフラ
バス (*Streptomyces microflavus*); ストレプトマイセス・オドリファー
(*Streptomyces odorifer*); ストレプトマイセス・パルバス (*Streptomyces parvus*);
ストレプトマイセス・プルリカラレセンス (*Streptomyces pluricoloescens*); ス

トレプトマイセス・ニューモニカス (*Streptomyces pneumonicus*); ストレプトマイ
セス・プレコックス (*Streptomyces praecox*); ストレプトマイセス・プニセウス
(*Streptomyces puniceus*); ストレプトマイセス・ラフィノサス (*Streptomyces*
raffinosis); ストレプトマイセス・ルトゲルセンシス (*Streptomyces*
rutgersensis); ストレプトマイセス・サンプソニイ (*Streptomyces sampsonii*);
ストレプトマイセス・セトニイ (*Streptomyces setonii*); ストレプトマイセス・シ
ンデネンシス (*Streptomyces sindenensis*); ストレプトマイセス・サルファレウス
(*Streptomyces sulphureus*); ストレプトマイセス・ウィルモレイ (*Streptomyces*
willmorei); ストレプトマイセス・ハワイエンシス (*Streptomyces hawaiiensis*);
ストレプトマイセス・アルボヘルバタス (*Streptomyces albobelvat*); ストレプ
トマイセス・オーリギネウス (*Streptomyces auriginus*); ストレプトマイセス・
カナリウス (*Streptomyces canarius*); ストレプトマイセス・クリセウス
(*Streptomyces chryseus*); ストレプトマイセス・フラビドビレンス (*Streptomyces*
flavidovirens); ストレプトマイセス・ヘルバチカス (*Streptomyces helveticus*);
ストレプトマイセス・ロンギスポロフラバス (*Streptomyces longisporoflavus*);
ストレプトマイセス・ニベウス (*Streptomyces niveus*); ストレプトマイセス・ポ
ーシジアスタチカス (*Streptomyces paucidiastaticus*); ストレプトマイセス・ス
フェロイデス (*Streptomyces spheroides*); ストレプトマイセス・ピンプリナ
(*Streptomyces pimprina*); ストレプトマイセス・カポアマス (*Streptomyces*
capoamus); ストレプトマイセス・シンナバリナス (*Streptomyces cinnabarinus*);
ストレプトマイセス・クリスタリナス (*Streptomyces crystallinus*); ストレプ
トマイセス・フラボトリシニ (*Streptomyces flavotricini*); ストレプトマイセス・
ゴビトリシニ (*Streptomyces gobitricini*); ストレプトマイセス・リンコルネンシ
ス (*Streptomyces lincolnensis*); ストレプトマイセス・メラノゲネス
(*Streptomyces melanogenes*); ストレプトマイセス・フェオクロモゲネス
(*Streptomyces phaeochromogenes*); ストレプトマイセス・フェオクロモゲネス亜
種 ク ロ ロ マ イ セ チ カ ス (*Streptomyces phaeochromogenes subsp.*

chloromyceticus); ストレプトマイセス・シュードベネズエラ (*Streptomyces pseudovenezuelae*); ストレプトマイセス・ロゼオビリジス (*Streptomyces roseoviridis*); ストレプトマイセス・スペクタビリス (*Streptomyces spectabilis*); ストレプトマイセス・サブラチラス (*Streptomyces subutilus*); ストレプトマイセス・アンブリナス (*Streptomyces umbrinus*); ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*); ストレプトマイセス・ザンソフェウス (*Streptomyces xanthophaeus*); ストレプトマイセス・オーレオモノポジアレス (*Streptomyces aureomonopodiales*); ストレプトマイセス・エクスフォリアタス (*Streptomyces exfoliatus*); ストレプトマイセス・フィラメントサス (*Streptomyces filamentosus*); ストレプトマイセス・プラニカラー (*Streptomyces prunicolor*); ストレプトマイセス・ロゼオフアルバス (*Streptomyces roseofulvus*); ストレプトマイセス・ロゼオラス (*Streptomyces roseolus*); ストレプトマイセス・ロゼオポラス (*Streptomyces roseoporus*); ストレプトマイセス・ルビギノソヘルボラス (*Streptomyces rubiginosohelvolus*); ストレプトマイセス・テルミタス (*Streptomyces termitum*); ストレプトマイセス・シンナモネンシス (*Streptomyces cinnamonensis*); ストレプトマイセス・コロンビエンシス (*Streptomyces colombiensis*); ストレプトマイセス・ゴシキエンシス (*Streptomyces goshikiensis*); ストレプトマイセス・カトレ (*Streptomyces katrae*); ストレプトマイセス・ラベンドフォリエ (*Streptomyces lavendofoliae*); ストレプトマイセス・ラベンズレ (*Streptomyces lavendulae*); ストレプトマイセス・ラベンズレ亜種アビレウス (*Streptomyces lavendulae* subsp. *avireus*); ストレプトマイセス・ラベンズレ亜種ブラシリカス (*Streptomyces lavendulae* subsp. *brasiliensis*); ストレプトマイセス・ラベンズレ亜種グラセリウス (*Streptomyces lavendulae* subsp. *grasseri*); ストレプトマイセス・ラベンズルカラー (*Streptomyces lavendulcolor*); ストレプトマイセス・ルリダス (*Streptomyces luridus*); ストレプトマイセス・オーキダセウス (*Streptomyces orchidaceus*); ストレプトマイセス・ラセモクロモゲネス (*Streptomyces racemochromogenes*); スト

レプトマイセス・シリング(*Streptomyces syringae*); ストレプトマイセス・トキシトリシニ(*Streptomyces toxytricini*); ストレプトマイセス・チュイラス(*Streptomyces tuius*); ストレプトマイセス・ビナセウス(*Streptomyces vinaceus*); ストレプトマイセス・ビルギニエ(*Streptomyces virginiae*); ストレプトマイセス・ラテリタス(*Streptomyces lateritus*); ストレプトマイセス・フラボバリアビリス(*Streptomyces flavovariabilis*); ストレプトマイセス・ジャンシナス(*Streptomyces janthinus*); ストレプトマイセス・プルプラセンス(*Streptomyces purpurascens*); ストレプトマイセス・ロゼオスピナス(*Streptomyces roseospinus*); ストレプトマイセス・ロゼオヴィオラセウス(*Streptomyces roseoviolaceus*); ストレプトマイセス・ビオラセウス(*Streptomyces violaceus*); ストレプトマイセス・ビオラセウス亜種コンフィナス(*Streptomyces violaceus* subsp. *confinus*); ストレプトマイセス・ビオラセウス亜種ビシナス(*Streptomyces violaceus* subsp. *vicinus*); ストレプトマイセス・ビオララス(*Streptomyces violarus*); ストレプトマイセス・ビオラタス(*Streptomyces violatus*); ストレプトマイセス・ヨコスカネンシス(*Streptomyces yokosukanensis*); ストレプトマイセス・アルボスポレウス(*Streptomyces albosporeus*); ストレプトマイセス・オーランチアカス(*Streptomyces aurantiacus*); ストレプトマイセス・オーレオバーチシラタス(*Streptomyces aureovorticillatus*); ストレプトマイセス・オーリニ(*Streptomyces aurini*); ストレプトマイセス・クレメウス(*Streptomyces cremeus*); ストレプトマイセス・ダヘスタニカス(*Streptomyces daghestanicus*); ストレプトマイセス・フラジエ(*Streptomyces fradiae*); ストレプトマイセス・フラジリス(*Streptomyces fragilis*); ストレプトマイセス・フマナス(*Streptomyces fumanus*); ストレプトマイセス・グロメロオーランチアカス(*Streptomyces glomeroaurantiacus*); ストレプトマイセス・グリセオビリジス(*Streptomyces griseoviridis*); ストレプトマイセス・ニベオルバー(*Streptomyces niveoruber*); ストレプトマイセス・ピューセチアス(*Streptomyces peucetius*); ストレプトマイセス・フェオビリジス

(*Streptomyces phaeoviridis*); ストレプトマイセス・ロゼイスクレロチカス
(*Streptomyces roseiscleroticus*); ストレプトマイセス・ロゼオフラバス
(*Streptomyces roseoflavus*); ストレプトマイセス・ロゼオリラシナス
(*Streptomyces roseolilacinus*); ストレプトマイセス・ルボ-シアネウス
(*Streptomyces rubo-cyaneus*); ストレプトマイセス・タウリカス (*Streptomyces*
tauricus); ストレプトマイセス・ビナセウス-ドラパス (*Streptomyces*
vinaceus-drappus); ストレプトマイセス・ヒロシダス (*Streptomyces virocidus*);
ストレプトマイセス・エリスレウス (*Streptomyces erythraeus*); ストレプトマイ
セス・ルテオフルオレセンス (*Streptomyces luteofluorescens*); ストレプトマイ
セス・エリスログリセウス (*Streptomyces erythrogriseus*); ストレプトマイセ
ス・ガリファラス (*Streptomyces garyphalus*); ストレプトマイセス・ラベンズラ
レクタス (*Streptomyces lavendularectus*); ストレプトマイセス・ナガサキエンシ
ス (*Streptomyces nagasakiensis*); ストレプトマイセス・ルブロラベンズレ
(*Streptomyces rubrolavendulae*); ストレプトマイセス・シンナモネンシス
(*Streptomyces cinnamonensis*); ストレプトマイセス・アシュカバシカス
(*Streptomyces ashchabadicus*); ストレプトマイセス・ポリクロモゲネス
(*Streptomyces polychromogenes*); ストレプトマイセス・アマクサエンシス
(*Streptomyces amakusaensis*); ストレプトマイセス・ケレスチス (*Streptomyces*
caelestis); ストレプトマイセス・アズレウス (*Streptomyces azureus*); ストレプ
トマイセス・ベラス (*Streptomyces bellus*); ストレプトマイセス・チャルトレウ
シス (*Streptomyces chartreusis*); ストレプトマイセス・ケリアタス
(*Streptomyces coeliatus*); ストレプトマイセス・ケルラタス (*Streptomyces*
coerulatus); ストレプトマイセス・ケルラタス亜種アミロリチカス (*Streptomyces*
coerulatus subsp. *amylolyticus*); ストレプトマイセス・ケルレオフアスカス
(*Streptomyces coeruleofuscus*); ストレプトマイセス・ケルレオルビダス
(*Streptomyces coeruleorubidus*); ストレプトマイセス・ケルレセンス
(*Streptomyces coerulescens*); ストレプトマイセス・クラコイ (*Streptomyces*

curacoi); ストレプトマイセス・シアネウス (*Streptomyces cyaneus*); ストレプトマイセス・シアノグロメラス (*Streptomyces cyanoglomerus*); ストレプトマイセス・インジゴカラー (*Streptomyces indigocolor*); ストレプトマイセス・ラナタス (*Streptomyces lanatus*); ストレプトマイセス・ラズレウス (*Streptomyces lazareus*); ストレプトマイセス・バリナス (*Streptomyces valynus*); ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス (*Streptomyces viridochromogenes*); ストレプトマイセス・グローセセンス (*Streptomyces glaucescens*); ストレプトマイセス・ブレンシス (*Streptomyces blensis*); ストレプトマイセス・ケルラタス亜種アナセウリ (*Streptomyces coerulatus* subsp. *anaseuli*); ストレプトマイセス・ケルレオロセウス (*Streptomyces coeruleoroseus*); ストレプトマイセス・イポメエ (*Streptomyces ipomoeae*); ストレプトマイセス・スピノサス (*Streptomyces spinosus*); ストレプトマイセス・グリセオマイシニ (*Streptomyces griseomycini*); ストレプトマイセス・グリセオストラミネウス (*Streptomyces griseostramineus*); ストレプトマイセス・プラシノスポラス (*Streptomyces prasinosporus*); ストレプトマイセス・ガネンシス (*Streptomyces ghanaensis*); ストレプトマイセス・ヒルスタス (*Streptomyces hirsutus*); ストレプトマイセス・プラシナス (*Streptomyces prasinus*); ストレプトマイセス・ビリドスポラス (*Streptomyces viridosporus*); ストレプトマイセス・アクリマイシニ (*Streptomyces acrimycini*); ストレプトマイセス・バンベルギエンシス (*Streptomyces bambergiensis*); ストレプトマイセス・プラシノピロサス (*Streptomyces prasinopilosus*); ストレプトマイセス・ホートン (*Streptomyces horton*); ストレプトマイセス・レクチビオラセウス (*Streptomyces rectiviolaceus*); ストレプトマイセス・リラシノフルバス (*Streptomyces lilacinofulvus*); ストレプトマイセス・モーベカラー (*Streptomyces mauvecolor*); ストレプトマイセス・ビオランシス (*Streptomyces violans*); ストレプトマイセス・ビオラセンス (*Streptomyces violascens*); ストレプトバーチシリウム・バルダシイ (*Streptoverticillium baldaccii*); ストレプトバーチシリウム・

フェルベンス (*Streptovercillium fervens*); ストレプトバーチシリウム・ルブ
ロクロリナム (*Streptovercillium rubrochlorinum*); ストレプトバーチシリウ
ム・ビベルチシラタム (*Streptovercillium biverticillatum*); ストレプトバー
チシリウム・オーレオバーサレス (*Streptovercillium aureoversales*); ストレ
プトバーチシリウム・ペンタチカム (*Streptovercillium pentaticum*); ストレプ
トバーチシリウム・ロゼオバーチシラタム (*Streptovercillium*
roseovercillatum); ストレプトバーチシリウム・ルubroバーチシラタム
(*Streptovercillium rubroverticillatum*); ストレプトバーチシリウム・ヒロシ
メンス (*Streptovercillium hiroshimense*); ストレプトバーチシリウム・サルモ
ニス (*Streptovercillium salmonis*); ストレプトバーチシリウム・ルテオバーチ
シラタム (*Streptovercillium luteovercillatum*); ストレプトバーチシリウ
ム・オリボレチキュリ (*Streptovercillium olivoreticuli*); ストレプトバーチ
シリウム・ワクスマニイ (*Streptovercillium waksmanii*); ストレプトバーチシ
リウム・グリセオカルネウム (*Streptovercillium griseocarneum*); ストレプト
バーチシリウム・シンナモネウム (*Streptovercillium cinnamoneum*); ストレプ
トバーチシリウム・ハチジョエンス (*Streptovercillium hachijoense*); ストレ
プトバーチシリウム・アルダム (*Streptovercillium arduum*); ストレプトバーチ
シリウム・アビコエンセ (*Streptovercillium abikoense*); ストレプトバーチシ
リウム・アルビレチキュリ (*Streptovercillium albireticuli*); ストレプトバー
チシリウム・ユーロシジカム (*Streptovercillium eurocidicum*); ストレプトバ
ーチシリウム・キシワデンセ (*Streptovercillium kishiwadense*); ストレプトバ
ーチシリウム・マシュエンセ (*Streptovercillium mashuense*); ストレプトバー
チシリウム・オリボバーチシラタム (*Streptovercillium olivovercillatum*);
ストレプトバーチシリウム・オリノシ (*Streptovercillium orinoci*); ストレプ
トバーチシリウム・パルビスポロゲネス (*Streptovercillium*
parvisporogenes); ストレプトバーチシリウム・ケンタケンセ
(*Streptovercillium kentuckense*); ストレプトバーチシリウム・アルバム

(*Streptoverticillium album*); ストレプトバーチシリウム・ジスタリカム
(*Streptoverticillium distallicum*); ストレプトバーチシリウム・エヒメンセ
(*Streptoverticillium ehimense*); ストレプトバーチシリウム・フラボペルシカム
(*Streptoverticillium flavopersicum*); ストレプトバーチシリウム・グリセオバ
ーチシラタム (*Streptoverticillium griseoverticillatum*); ストレプトバーチシ
リウム・ネトロプシス (*Streptoverticillium netropsis*); ストレプトバーチシリ
ウム・レクチバーチシラタム (*Streptoverticillium rectiverticillatum*); ストレ
プトバーチシリウム・セプタタム (*Streptoverticillium septatum*); ストレプトバ
ーチシリウム・モバレンセ (*Streptoverticillium mobaraense*); ストレプトバーチ
シリウム・ブラストマイセチカム (*Streptoverticillium blastmyceticum*); ストレ
プトバーチシリウム・ラベンズリグリセウム (*Streptoverticillium
lavenduligriseum*); ストレプトバーチシリウム・リラシナム
(*Streptoverticillium lilacinum*); ストレプトバーチシリウム・カシュミレンセ
(*Streptoverticillium kashmirensense*); ストレプトバーチシリウム・シオルテウム
(*Streptoverticillium thioluteum*); スポリチシア・ポリモルファ (*Sporichthya
polymorpha*); ミクロエロボスポリア・シネレア (*Microellobosporia cinerea*);
ミクロエロボスポリア・ビオラセア (*Microellobosporia violacea*); ミクロエロボ
スポリア・フラベア (*Microellobosporia flavea*); ミクロエロボスポリア・グリセ
ア (*Microellobosporia grisea*); ミクロモノスポラ・カルセア (*Micromonospora
chalcea*); ミクロモノスポラ・ハロフィチカ (*Micromonospora halophytica*); ミク
ロモノスポラ・カルボナセア (*Micromonospora carbonacea*); ミクロモノスポラ・
ナラシノエンシス (*Micromonospora narashinoensis*); ミクロモノスポラ・メラノ
スポレア (*Micromonospora melanosporea*); ミクロモノスポラ・エキノスポラ
(*Micromonospora echinospora*); ミクロモノスポラ・プルプレア (*Micromonospora
purpurea*); ミクロモノスポラ・プルプレオクロモゲネス (*Micromonospora
purpureochromogenes*); ミクロモノスポラ・ビカラー (*Micromonospora bicolor*);
ミクロモノスポラ・ケルレア (*Micromonospora coerulea*); ミクロモノスポラ・グ

ロボサ (*Micromonospora globosa*); ミクロモノスポラ・エロンガタ (*Micromonospora elongata*); ミクロモノスポラ・パルバ (*Micromonospora parva*); ミクロモノスポラ・ガリカ (*Micromonospora gallica*); ミクロモノスポラ・アセトフォルミシ (*Micromonospora acetoformici*); ミクロモノスポラ・プロピオニシ (*Micromonospora propionici*); サーモアクチノマイセス・ブルガリス (*Thermoactinomyces vulgaris*); サーモアクチノマイセス・サッカリ (*Thermoactinomyces sacchari*); アクチノビフィダ・ジコトミカ (*Actinobifida dichotomica*); アクチノビフィダ・アルバ (*Actinobifida alba*); アクチノビフィダ・クロモゲナ (*Actinobifida chromogena*); サーモモンスポラ・カーバタ (*Thermomonospora curvata*); サーモモンスポラ・ビリジス (*Thermomonospora viridis*); ミクロビスポラ・ロゼア (*Microbispora rosea*); ミクロビスポラ・エラタ (*Microbispora aerata*); ミクロビスポラ・アメシストゲネス (*Microbispora amethystogenes*); ミクロビスポラ・ビスポラ (*Microbispora bispora*); ミクロビスポラ・クロモゲネス (*Microbispora chromogenes*); ミクロビスポラ・ジアスタチカ (*Microbispora diastatica*); ミクロビスポラ・パルバ (*Microbispora parva*); ミクロビスポラ・サーモジアスタチカ (*Microbispora thermodiastatica*); ミクロビスポラ・サーモロセア (*Microbispora thermorosea*); ミクロポリスポラ・ブレビカテナ (*Micropolyspora brevicatena*); ミクロポリスポラ・アンギオスポラ (*Micropolyspora angiospora*); ミクロポリスポラ・ケシア (*Micropolyspora caesia*); ミクロポリスポラ・フェニ (*Micropolyspora faeni*); ミクロポリスポラ・レクチビルグラ (*Micropolyspora rectivirgula*); ミクロポリスポラ・ルブロブルネア (*Micropolyspora rubrobrunea*); ミクロポリスポラ・サーモビリダ (*Micropolyspora thermovirida*); 及びミクロポリスポラ・ビリジニグラ (*Micropolyspora viridinigra*)。

微生物、好ましくは細菌に由来する可溶性成分を入手する方法は特に限定されないが、通常は微生物から抽出操作により入手できる。抽出の条件は特に限定されず、当業者に利用可能な条件を採用できる。溶媒の種類は特に限定されるもの

ではないが、好ましくは、最終工程の洗浄段階で除去しやすいアルコール、アセトン、ピリジン、又は 40℃以上の熱水のいずれか、又はそれらの混合物を用いることができる。

上記 (b) の工程において、例えば、市販されている乾燥 BCG 製剤（日本ビーシージー製造株式会社、12 mg 入り）1 本に対してエタノール 1 ml を加え、十分に攪拌した後、微量高速遠心器にて 12,000× g (12,000 rpm) で 5 分間遠心し、その上清を採取して別の乾燥 BCG 製剤 1 本に加え、再び十分に攪拌し、その後、微量高速遠心器にて 12,000× g (12,000 rpm) で 5 分間遠心し、その上清を採取して微生物に由来する可溶性成分の抽出液とすることもできる。

この抽出液を (a) の工程で製造した固定化生体材料の断片に添加することによって、微生物由来の可溶性成分を該断片に固定化することができる。固定化の手段も特に限定されることはなく、当業者に利用可能な方法を適宜用いればよい。固定化とは、該断片の表面に微生物由来の可溶性成分が容易に脱落しない状態で一時的又は半永久的に結合している状態を意味しており、化学的結合の形成あるいは物理化学的な相互作用などを含めて固定化の用語は最も広義に解釈する必要がある。

例えば、固定生体組織断片を微量高速遠心器にて 12,000× g (12,000 rpm) で 5 分間遠心し、パックした容量 10 μ l に対して 100 μ l の細菌エタノール抽出液を加え、攪拌後、0.1 容量の滅菌超純水を添加し、再び攪拌する。その後、さらに 0.3 容量の滅菌超純水を添加し、再度攪拌した後、さらに滅菌超純水を添加していき、当初の細菌エタノール抽出液量の 100 倍量、すなわち 10 ml とする。上記の操作において十分に攪拌を行うことにより、微生物由来の可溶性成分は固体化生体材料断片に固定化される。その後、固体化生体材料断片を遠心分離し、さらに滅菌超純水で洗浄すると、純水可溶性成分は容易に除去されるが、この洗浄操作によっても除去されない微生物由来エタノール可溶性成分が固体化生体材料断片に結合した状態で残る。これを本発明のアジュバントとして用いることができる。もっとも、上記の製造方法は一例であり、本発明のアジュバントの製造方法

は上記の具体例に限定されることはない。当業者には、上記の方法は適宜の修飾ないし改変が可能であり、材料や条件などを適宜選択できることは容易に理解される。

本発明の免疫アジュバントを特定の動物に対して適用する場合、上記の例における固体化生体材料として、当該動物とは異種の動物由来の組織を用いることもできる。このようにして得られるアジュバントは、異種動物組織への拒絶反応を伴う不溶性免疫アジュバントとして利用可能である。

また、固体化生体材料として腫瘍患者の摘出腫瘍ホルマリン固定組織を用い、細菌由来可溶性成分を固定化した免疫アジュバントを製造してもよい。このような免疫アジュバントは、ヒト腫瘍抗原を含む腫瘍ワクチンの主たる成分として利用可能である。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中の略語は以下のとおりである。CTL、細胞傷害性Tリンパ球；FBS、ウシ胎児血清；LPS、リポポリサッカライド；NK、ナチュラルキラー；PBMC、末梢血単核細胞；IL、インターロイキン；PBS(+)、カルシウム・マグネシウム含有ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水；PBS(-)、カルシウム・マグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水。

例1： BCG 可溶性成分不溶化アジュバント（BCG 菌由来エタノール可溶性成分を固着させたホルマリン固定肝癌組織断片）によるヒト末梢血付着性細胞の刺激効果

1. ホルマリン固定ヒト肝癌組織の断片化と洗浄

ヒト肝癌摘出組織を市販中性ホルマリン液に室温にて3日間以上浸漬して固定した。この組織を取り出し、眼科バサミにて径1 mm程度の細かいミンスとし、PBS(+)を元の肝癌湿重量の3-10倍量加え、さらに氷冷しつつホモジェナイザー

(ハイドルフ社製 DIAX-600、ゼネレーターシャフト TYPE 10F) にて 30 秒間ホモジェナイズした。このホモジェナイズは氷冷するために間隔を 30 秒以上あけながら数回繰り返した。このホモジェネート 1.2 ml を 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブにとり、エッペンドルフ微量高速遠心機にて $17,000 \times g$ (15,000 rpm) で 5 分間遠心した。

この沈殿を 70%アルコールに懸濁して遠心し上清を除去した後、元の容量の PBS(+) に再度懸濁した。これを、ナイロンメッシュを通過させた。通過した懸濁液 1.2 ml を 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブにとり、微量高速遠心機にて 15,000 rpm、3 分間遠心し、packed volume を計測した。計測は一定量の水を入れた 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブと比較して行った。

2. BCG 菌体由来エタノール可溶性成分の調製

乾燥 BCG ワクチンアンプル一本 (日本ビーシージー製造株式会社、12 mg 入り) を 110°C で 5 分間、オートクレーブにかけ、エタノール 1 ml を加え、6 時間以上攪拌した後、微量高速遠心器にて $12,000 \times g$ (12,000 rpm) で 5 分間遠心し、その上清を採取して別の乾燥 BCG 製剤 1 本に加え、再び十分に攪拌し、その後、微量高速遠心器にて 12,000 rpm で 5 分間遠心し、この上清を回収し、BCG 菌体由来エタノール可溶性成分溶液 (以下 BCG 抽出液という) とした。

3. BCG 可溶性成分不溶化アジュバントの調製

上記 1. で洗浄したホルマリン固定ヒト肝癌組織断片の PBS(+) 懸濁液を、該断片が概略 100 万個/ml 程度になるように PBS(-) で希釈した。この懸濁液 1 ml を $12,000 \times g$ (12,000 rpm) にて 5 分間遠心し、沈殿に対して 99.5%エタノール 1 ml を加えて懸濁した。もう一度、12,000 rpm にて 5 分間遠心し沈殿を得た。これに、BCG 抽出液 0.1 ml を添加、攪拌した。この後、攪拌しつつ、0.01 ml の純水を加え、以後さらに、0.03 ml、0.1 ml を加えて一時間攪拌、0.76 ml を加えて一時間攪拌、9 ml と順次ゆっくりと純水を加えていき、最後には一夜攪拌を続けた。

上記の攪拌液を遠心操作によって純水にて 3 回洗浄した。沈殿を 1 ml の PBS(-)

に懸濁し、また遠心して沈殿を得、1 ml の 20%FBS を含む RPMI 培養液に懸濁した。これを BCG 可溶性成分不溶化アジュバントを含有する細胞刺激用培養液とした。この他、表 1 に示したように、BCG 可溶性成分不溶化アジュバントと同量のホルマリン固定肝癌組織断片を含む細胞刺激用培養液等、種々の添加成分を含む細胞刺激用培養液を作製した。

4. BCG 可溶性成分コーティングシート断片の調製

BCG 抽出液でホルマリン固定ヒト肝癌組織断片をコーティングすることによって作製した不溶化アジュバントの対照用として、3 mm 四方の発泡プラスチックシート（炭酸水素ナトリウム試薬瓶（和光純薬）の蓋用パッキング材）に BCG 抽出液 2 μ l を滴下して風乾したシート断片を作製した。この BCG 可溶性成分コーティングシート断片は培養液に浮くため、固定ヒト肝癌組織断片とともに細胞培養液中に添加しても、両者は直ちに分離し、該断片が BCG 抽出液中の成分によってコーティングされることはない。

5. 陽性対照用 LPS の調製

ヒト末梢血付着性細胞を刺激し、GM-CSF を放出させることが知られているリボポリサッカライド（以下、LPS という）（シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京）を 20%FBS 含有 RPMI 培養液に、終濃度 10 ng/ml となるように溶解した。

6. ヒト末梢血付着性細胞の調製

常法により健常人末梢血をヘパリン処理血として採血した。15 ml のヘパリン処理血を同容量の PBS(-) で希釈した後、Lymphoprep (NYCOMED PHARMA, Norway) チューブ内のネット上に乗せるようにゆっくり添加し、800 g で 20 分間遠心した。白血球が多いネット直上の白濁層を回収し、PBS(-) で洗った。洗浄は Lymphoprep の製造業者による使用マニュアルに記載された遠心操作に従った。

培養用 96-ウェルプレートにウェル当たり 40 μ l の 20%FBS 含有 RPMI 培養液を入れ、あらかじめ適宜インキュベートしておいた。上記の白血球分画から得た細胞を 500 万個/ml となるように 20%FBS 含有 RPMI 培養液にて希釈した細胞懸濁液をウェル当たり 200 μ l ずつ播種した。1 時間インキュベート後、付着した細

胞を、あらかじめ 37°C に加温した 20% FBS 含有 RPMI 培養液で 2 回洗浄した。鏡検下で観察したところ、付着性細胞には単球が非常に多かった。

7. BCG 可溶性成分不溶化アジュバントによるヒト末梢血付着性細胞の刺激

洗浄後の付着性細胞に細胞刺激用培養液をウェル当たり 200 μ l 添加し、24 時間培養後、上清を回収、12,000 \times g (12,000 rpm) にて 5 分間遠心し上清を得た。この上清は -80°C にて保存した。なお、BCG 可溶性成分コーティングシート断片は、ウェル当たり 1 個を BCG 可溶性成分コーティング面を下にしてウェル内の培養液に浮かせた。

8. 付着性細胞刺激効果の測定方法

ヒト GM-CSF の ELISA 法による測定用キット (Amersham, England) を用い、このキットの製造業者による測定マニュアルに従って、前項の保存上清中の GM-CSF 含量を定量した。

結果を表 1 に示す。1 個の測定平均値 (培養上清中の濃度 pg/ml で記載) は、独立した 2 ウェルの測定値から得たものである。

BCG 可溶性成分不溶化アジュバントは、陽性対照とした LPS (終濃度 10 ng/ml) に比肩できるヒト末梢血付着性細胞刺激効果を持っていることが判明した。対照とした同一人由来の、BCG 可溶性成分を固定化していないホルマリン固定肝癌組織断片では、6 分の 1 以下の GM-CSF 濃度の刺激効果しか得られず、これと BCG 可溶性成分コーティングシート断片を同時に添加しても、BCG 可溶性成分不溶化アジュバントに等しい大きな刺激効果は得られなかった。従って、ホルマリン固定肝癌組織断片に BCG 可溶性成分が固定化していることが重要であることが理解できる。

表 1

細胞刺激用培養液に添加した成分	培養上清中の GM-CSF 濃度 (pg/ml)
1. 対照 (培養液のみ)	5.9
2. ホルマリン固定肝癌組織断片	13.4
3. BCG 可溶性成分不溶化アジュバント	85.8
4. BCG 可溶性成分コーティングシート断片	11.5
5. ホルマリン固定肝癌組織断片 +BCG 可溶性成分コーティングシート断片	7.3
6. BCG 可溶性成分不溶化アジュバント +BCG 可溶性成分コーティングシート断片	71.8
7. 陽性対照用 LPS	71.1

例 2 : BCG 可溶性成分と BCG 可溶性成分不溶化アジュバントによるヒト末梢血
付着性細胞の刺激効果の比較

例 1 の方法にしたがって、ホルマリン固定ヒト肝癌組織の断片化と洗浄、BCG
菌体由来エタノール可溶性成分の調製、BCG 可溶性成分不溶化アジュバントの調
製、陽性対照用 LPS の調製、ヒト末梢血付着性細胞の調製、BCG 可溶性成分不溶
化アジュバントによるヒト末梢血付着性細胞の刺激、付着性細胞刺激効果の測定
を行った。ただし、BCG 可溶性成分コーティングシート断片を培養液に浮かせる
かわりに、BCG 抽出液を、培養用 96-ウエルプレートにウエル当たり 2 μ l 添加
した。これに対する比較のために、他のウエルにもエタノールをウエル当たり 2
 μ l 添加した。

結果を表 2 に示す。1 個の測定平均値 (培養上清中の濃度 pg/ml で記載) は、
対照 (培養液のみ) と、これにエタノールを添加した場合を除き、独立した 4 ウ

エルの測定値から得たものである。産生された GM-CSF 濃度で比較したヒト末梢血付着性細胞刺激効果は、あらかじめ BCG 可溶性成分を固定化せず、ホルマリン固定肝癌組織断片と BCG 抽出液を別々にして添加したウェルでは、事前の固定化操作により BCG 可溶性成分と固定肝癌組織断片とを一体化した BCG 可溶性成分不溶化アジュバントを添加したウェルには及ばなかった。この結果は、BCG 可溶性成分が可溶性のままでは、GM-CSF 産生刺激効果は弱く（したがってアジュバント効果も弱く）、強い細胞刺激効果は、BCG 可溶性成分の不溶化に依存していることを示している。ただし、例 1 の結果より、固定肝癌組織断片に BCG 可溶性成分が固定化していることが重要であり、ホルマリン固定肝癌組織断片は細胞に貪食されるため、BCG 可溶性成分も細胞内に持ち込まれると考えられる。すなわち、BCG 可溶性成分は、微量であっても細胞内部から細胞を刺激できるため、極めて効率の高い刺激効果を現すことになる。こうして細胞を活性化する不溶化アジュバントは、細胞内に持ち込まれたホルマリン固定肝癌組織断片の細胞内処理を、結果的に一層刺激する効果をもたらすものと考えられる。

表 2

細胞刺激用培養液に添加した成分	培養上清中の GM-CSF 濃度 (pg/ml)
1. 対照 (培養液のみ)	7.8 *
2. 対照 (培養液のみ) + エタノール	8.2 *
3. ホルマリン固定肝癌組織断片	8.1 ± 0.1 **
4. ホルマリン固定肝癌組織断片 + エタノール	8.1 ± 0.4 **
5. BCG 可溶性成分不溶化アジュバント	88.8 ± 29.2 **
6. BCG 可溶性成分不溶化アジュバント + エタノール	68.0 ± 19.3 **
7. ホルマリン固定肝癌組織断片 + BCG 抽出液	8.4 ± 0.1 **
8. BCG 抽出液	8.3 ± 0.3 **
9. 陽性対照用 LPS	196 ± 28.0 **
10. 陽性対照用 LPS + エタノール	141 ± 13.4 **

* 1 ウエルの観測値。 ** 4 ウエルの平均値 ± 標準偏差。

産業上の利用可能性

本発明の免疫アジュバントは、強い細胞刺激効果を有しており、生体にとって安全性が高い免疫アジュバントとして利用できる。固定化生体組織としてホルマリン固定化腫瘍組織を使用すれば、複雑多岐にわたる腫瘍抗原と免疫アジュバントを一体として効率よく抗原提示細胞に取り込ませることができる。そのため、効果的な腫瘍免疫反応を惹起でき、有効ながん治療が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 免疫アジュバントであって、ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製され、有機溶媒及び／又は熱水で洗浄することにより可溶性成分が除去された断片を含み、該断片に微生物に由来する可溶性成分を固定化した免疫アジュバント。
2. ヒトの組織又は細胞が腫瘍組織及び／又は腫瘍細胞である請求の範囲第1項に記載の免疫アジュバント。
3. ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化材料がホルマリン固定組織及び／又はホルマリン固定細胞である請求の範囲第1項又は第2項に記載の免疫アジュバント。
4. 微生物が細菌である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の免疫アジュバント。
5. 微生物に由来する可溶性成分がアルコール抽出物、アセトン抽出物、ピリジン抽出物、及び熱水抽出物からなる群から選ばれる少なくとも1種の抽出物である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の免疫アジュバント。
6. 免疫アジュバントの製造方法であって、以下の工程：
 - (a) ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製された断片を、有機溶媒及び／又は熱水にて洗浄して可溶性成分を除去する工程；及び
 - (b) 上記工程(a)で得られた該断片に微生物に由来する可溶性成分を固定化する工程を含む方法。
7. ヒトの腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製され、有機溶媒及び／又は熱水で洗浄することにより可溶性成分が除去された断片を含み、該断片に微生物に由来する可溶性成分が固定化された免疫アジュバントを有効成分として含む腫瘍ワクチン。

8. 腫瘍の治療方法であって、固体化された該材料が由来する患者に請求の範囲第7項に記載の腫瘍ワクチンを投与する工程を含む方法。

要 約 書

強い細胞刺激効果を有しており、生体にとって安全性が高い免疫アジュバントであって、ヒトを含む動物の組織、細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された材料から調製され、有機溶媒及び／又は熱水で洗浄することにより可溶性成分が除去された断片を含み、該断片に微生物に由来する可溶性成分を固定化した免疫アジュバント。